

Untersuchung entwicklungsspezifischer Gibberellin-Signalwege in *Cucurbita maxima* L.

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Nicole Knop
aus Göttingen

1. Referent: Professor Dr. Theodor Lange
2. Referent: Professor Dr. Ralf-Rainer Mendel
eingereicht am: 24.08.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 07.12.2011

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Knop, N.; Pimenta Lange, M. J.; Schuurink, R.; Lange, T.: Gibberellin signalling during pumpkin seedling development. Poster. Botanikertagung, Leipzig (2009).

Knop, N.; Jauk, A.; Frenzel, E.; Fischer, A.; Lange, T.; Pimenta Lange, M. J.: Pumpkin flower development is controlled by gibberellin. Poster. Botanikertagung, Leipzig (2009).

Knop, N.; Pimenta Lange, M. J.; Lange, T.: Gibberellin fine-tuning of pumpkin seedling growth. Poster. The International Plant Growth Substances Association, Tarragona, Spanien (2010).

Knop, N.; Lange, T.; Pimenta Lange, M. J.: Regulation of pumpkin male flower development by gibberellins. Poster. The International Plant Growth Substances Association, Tarragona, Spanien (2010).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1 Einleitung	3
1.1 Gibberellin	3
1.1.1 Gibberellin-Biosynthese	5
1.1.2 Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion	10
1.1.3 Gibberellin-Wirkung	14
1.2 Virus induziertes Gen-Silencing (VIGS)	14
1.2.1 virale Vektoren	15
1.2.2 Mechanismus des VIGS	17
1.3 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Pflanzenmaterial	20
2.1.1 Pflanzenanzucht	20
2.1.2 Ernte des Pflanzenmaterials	21
2.2 Bakterienanzucht	24
2.2.1 Bakterienstämme	24
2.2.2 Plasmide	25
2.2.3 Kultivierungsbedingungen	25
2.2.4 Erstellung von Stammkulturen	26
2.3 allgemeine molekularbiologische Methoden	27
2.3.1 Vorbereitung benötigter Geräte und Lösungen	27
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.3.3 Agarosegelelektrophorese	27
2.3.4 Alkoholpräzipitation	28
2.3.5 Sequenzierung	28
2.4 Nukleinsäureaufreinigung	29
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA	29
2.4.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	29
2.4.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Reaktionen	30
2.4.4 Extraktion von Gesamt-RNA	30

2.5	Enzymatische Modifizierung	31
2.5.1	Verdau mit Restriktionsenzymen	31
2.5.2	Auffüllen von 5`-Überhängen und Entfernung von 3`-Überhängen	32
2.5.3	Ligation	32
2.5.4	DNaseI-Verdau mit anschließender Erhitzung	34
2.5.5	DNaseI-Verdau mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion	34
2.6	Transfer von DNA	35
2.6.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	35
2.6.2	Elektroporation	35
2.6.3	chemische Transformation	36
2.7	Reverse Transkription (RT)	37
2.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
2.8.1	PCR mit genspezifischen Primern	38
2.8.2	PCR mit degenerierten Primern	39
2.9	Klonierung der Gibberellin-Dioxygenasen	40
2.9.1	PCR basiertes „Screening“	41
2.9.2	RNA Ligase Mediated-RACE (RLM-RACE)	42
2.9.3	Klonierung des kodierenden Bereichs	44
2.9.4	Sequenzanalyse	45
2.10	kompetitive Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	46
2.10.1	Herstellung der internen Standard-RNA	46
2.10.2	Überprüfung der Spezifität der kompetitiven RT-PCR	51
2.10.3	Quantifizierung der Transkriptgehalte	52
2.11	allgemeine biochemische Methoden	54
2.11.1	Aufreinigung über Sep-pak-Kartuschen	54
2.11.2	Methylierung	54
2.11.3	Silylierung	54
2.11.4	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	55
2.11.5	kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	56
2.12	Enzymassay	57
2.12.1	Klonierung des kodierenden Bereichs in einen Expressionsvektor	57
2.12.2	Herstellung rekombinanter Proteine	58
2.12.3	Inkubation mit radioaktiv markierten Gibberellinen	59
2.12.4	Aufreinigung, Fraktionierung, Derivatisierung und Analyse der Gibberelline	59
2.12.5	Identifizierung der Gibberelline	60

2.13	Identifizierung und Quantifizierung endogener Gibberelline	60
2.13.1	Extraktion endogener Gibberelline	60
2.13.2	Aufreinigung, Fraktionierung, Derivatisierung und Analyse der Gibberelline	61
2.13.3	Identifizierung und Quantifizierung der endogenen Gibberelline	62
2.14	Virus induziertes Gen-Silencing (VIGS)	64
2.14.1	Erstellung des TRV-Konstrukts	65
2.14.2	Infizierung der Pflanzen	65
2.14.3	Nachweis der viralen RNA und der Transkripte	67
2.15	Chemikalien und Enzyme	68
2.16	Geräte	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Identifizierung und Klonierung von Gibberellin-Dioxygenasen aus Wurzelspitzen 7 Tage alter Kürbiskeimlinge	71
3.1.1	Identifizierung und Klonierung neuer Gibberellin-Dioxygenasen	71
3.1.2	Sequenzen der Gibberellin-Dioxygenasen	72
3.2	Charakterisierung der Gibberellin-Dioxygenasen	75
3.2.1	Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Gibberellin 20-Oxidase-4	75
3.2.2	Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Gibberellin 3-Oxidase-4	76
3.2.3	Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Gibberellin 2-Oxidase-2 und der Gibberellin 2-Oxidase-3	77
3.3	Quantifizierung der Transkriptgehalte der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene	81
3.3.1	Quantifizierung der Transkriptgehalte der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene in Kürbiskeimlingen	81
3.3.2	Einfluss von Gibberellin auf die Expression der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene in Kürbiskeimlingen	87
3.3.3	Quantifizierung der Transkriptgehalte der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene in männlichen Kürbisblüten	91
3.4	Identifizierung und Quantifizierung der endogene Gibberelline in männlichen Kürbisblüten	97
3.4.1	Gibberelline des Nicht-13-Hydroxylierungsweges	97
3.4.2	Gibberelline des 13-Hydroxylierungsweges	100
3.5	Einfluss von Gibberellin auf die vegetative und reproduktive Entwicklung von Kürbispflanzen	101

3.6	Etablierung eines Virus induzierten Gen-Silencing-Systems	103
3.6.1	Virus induziertes Gen-Silencing in Kürbis	104
3.6.2	Virus induziertes Gen-Silencing in Gurke	107
4	Diskussion	109
4.1	Identifizierung neuer Gibberellin-Dioxygenasen in Kürbiskeimlingen	109
4.2	Regulation der Genexpression	112
4.3	Gibberellin-Signalwege während der Keimlingsentwicklung	114
4.4	Gibberellin-Signalwege während der Entwicklung männlicher Kürbisblüten	118
4.5	Virus induziertes Gen-Silencing in Kürbis und Gurke	123
5	Zusammenfassung	126
6	Anhang	128
6.1	verwendete Primer und Temperaturprogramme der PCR	128
6.2	Gelbilder der Klonierung der neuen Gibberellin-Dioxygenasen	132
6.3	Nukleotidsäure- und Aminosäuresequenzen	133
6.4	HPLC-Läufe und Massenspektren der Charakterisierung	137
6.5	Rohdaten und Gelbilder der quantitativen RT-PCR	145
6.6	Rohdaten der endogenen Gibberelline	167
6.7	Messdaten der Kürbispflanzen und Kürbisblüten	168
6.8	Gelbilder des Nachweis der viralen RNA und der Transkripte	169
	Literaturverzeichnis	170
	Danksagung	179

Abkürzungen

bp	Basenpaare
cDNA	von RNA synthetisierte DNA (complementary DNA)
cpm	counts per minute, Maßeinheit der Radioaktivität: <u>detektierte</u> Zerfälle pro Minute
d	Tag
DEPC	Diethylpyrophosphat
DNA	Deoxyribunokleinsäure
DNase	Deoxyribunoklease
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphat; umfasst Deoxyadenosintriphosphat (dATP), Deoxycytintriphosphat (dCTP), Deoxyguanintriphosphat (dGTP), Deoxythymidintriphosphat (dTTP)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	disintegrations per minute, Maßeinheit der Radioaktivität: Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GA	Gibberellin
GA _n	Gibberellin A _n
GC-MS	kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GID1	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1
h	Stunde
H	Hypokotyl bzw. Hypanthium
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
K	Kotyledone
M	Molarität
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (phosphoryliert)
nt	Nukleotid
NTPs	Nucleosidtriphosphat; umfasst Adenosintriphosphat (ATP), Cytintriphosphat (CTP), Guanintriphosphat (GTP), Thymidintriphosphat (TTP)
OD	Optische Dichte
P	Petale
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
S	Sepale
Ss	Sprossspitze
St	Stamina
Tm	Schmelztemperatur (melting temperature)
U	Unit (Enzymeinheit)
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
VIGS	Virus induziertes Gen-Silencing
W	Wurzelrest
Ws	Wurzelspitze
w/v	Masse/Volumen (weight/volume)

1 Einleitung

1.1 Gibberellin

Gibberelline gehören zu einer Klasse von wachstumsfördernden Stoffen des Pflanzenmetabolismus, die an Anlehnung an das tierische Hormonkonzept als Phytohormone (griechisch; *phyton*: Pflanze, *horman*: antreiben) oder Pflanzenhormone bezeichnet wurden. Dabei bilden die Phytohormone aus chemischer Sicht eine heterologe Gruppe aus niedermolekularen Substanzen bestehend aus Auxinen, Cytokininen, Gibberellinen, Abscisinsäure, Ethylen, Brassinosteroiden, Jasmonsäure, Salycilsäure und Systemin.

Die Bezeichnung Gibberellin ist auf die erste Isolierung des Phytohormons aus den Filtraten des phytopathogenen Ascomyceten *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) zurückzuführen (Yabuta, 1935). Dieser befiel im 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts Reispflanzen (*Oryza sativa* L.) in Japan, wobei er ein Gemisch aus den später identifizierten Gibberellin A₁ (GA₁) und GA₃ (Takahashi et al., 1955) absonderte und so die als „Bakanae“ bezeichnete Krankheit hervorrief. Die erkrankten Pflanzen knickten dabei auf Grund verlängerter Internodien um und besaßen hellgrüne Blätter, verkümmerte Wurzeln sowie einen geringeren Ertrag.

Der Nachweis, dass Gibberellin nicht nur einen Einfluss auf höhere Pflanzen besitzt, sondern auch in diesen natürlich vorkommt, erfolgte in den 1950er Jahren. Erste Untersuchungen zeigten einen vergleichbaren Einfluss der aus *Gibberella fujikuroi* isolierten Gibberellinsäure (GA₃) zu Extrakten hochgewachsener Erbsenkeimlinge (Brian & Hemming, 1955; Radley, 1956). So besaßen behandelte zwergwüchsige Erbsenpflanzen in beiden Fällen ein zum Wildtyp entsprechendes Wachstum.

1958 wurde schließlich das erste Gibberellin aus höheren Pflanzen, GA₁, aus Feuerbohnsamen (*Phaseolus coccineus* L.) isoliert (MacMillan & Suter, 1958). Alle weiteren Gibberelline wurden nach diesem Beispiel als GA_n bezeichnet, wobei die Nummerierung in der Reihenfolge ihrer Entdeckung erfolgte und erfolgt (MacMillan & Takahashi, 1968). Eine Aussage über den chemischen Aufbau, die biologische Aktivität oder einer Ähnlichkeit zu anderen Gibberellinen schließt sich somit nicht aus der Bezeichnung.

Zum heutigen Zeitpunkt wurden 136 Gibberelline isoliert und untersucht (http://www.plant-hormones.info/gibberellin_nomenclature.htm), von denen nur wenige, wie GA₁, GA₃ oder GA₄, eine physiologische Aktivität in Pflanzen aufweisen.

Alle Gibberelline sind dabei tetracyclische Diterpene, welche auf dem Grundgerüst *ent*-Gibberellan beruhen (Abb. 1.1). Dabei variieren die einzelnen Gibberelline durch Modifizierung der funktionellen Gruppen, der Anzahl und Lage von Hydroxylgruppen am Grundgerüst sowie der Oxidationsstufe am C20-Atom. So können Gibberelline in zwei Gruppen eingeteilt werden, C₂₀- bzw. C₁₉-Gibberelline (Abb. 1.1).

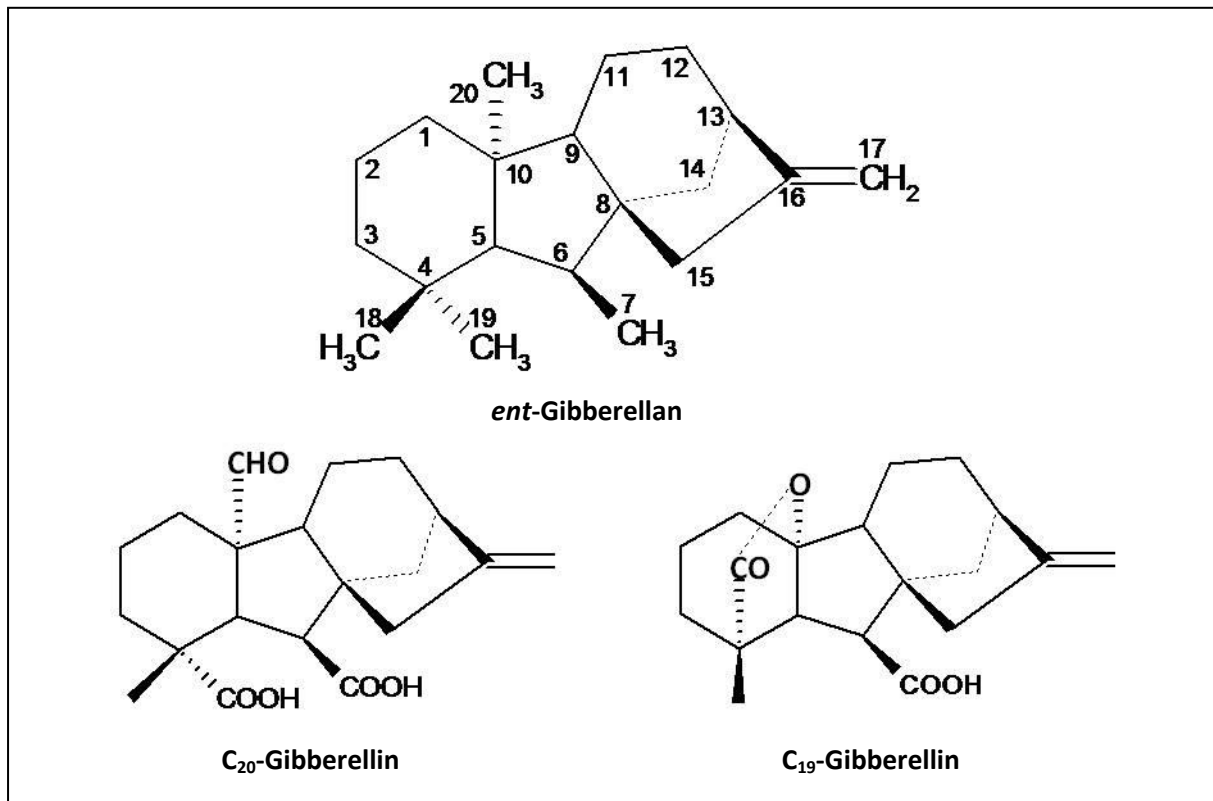


Abb. 1.1: Strukturformel des *ent*-Gibberellans sowie der C₂₀-Gibberelline am Beispiel des GA₂₄ und C₁₉-Gibberelline am Beispiel des GA₉

Dabei dienen die C₂₀-Gibberelline als Vorstufen zur Bildung der physiologisch aktiven C₁₉-Gibberelline. Dazu erfolgt eine Decarboxylierung, wodurch ein γ -Lactonring zwischen dem C19-Atom und dem C10-Atom vorliegt. Des Weiteren besitzen physiologisch aktive Gibberelline eine 3 β -Hydroxylgruppe und eine Carboxylgruppe am C6-Atom (Abb. 1.2), welche an der Bindung an den Gibberellin-Rezeptor beteiligt sind (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008).

Neben den Vorstufen und den physiologisch aktiven Gibberellinen gehören auch deren inaktivierte Formen zu den C₁₉-Gibberellinen. Diese besitzen eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C2-Atom in der β -Konfiguration (Abb. 1.2).

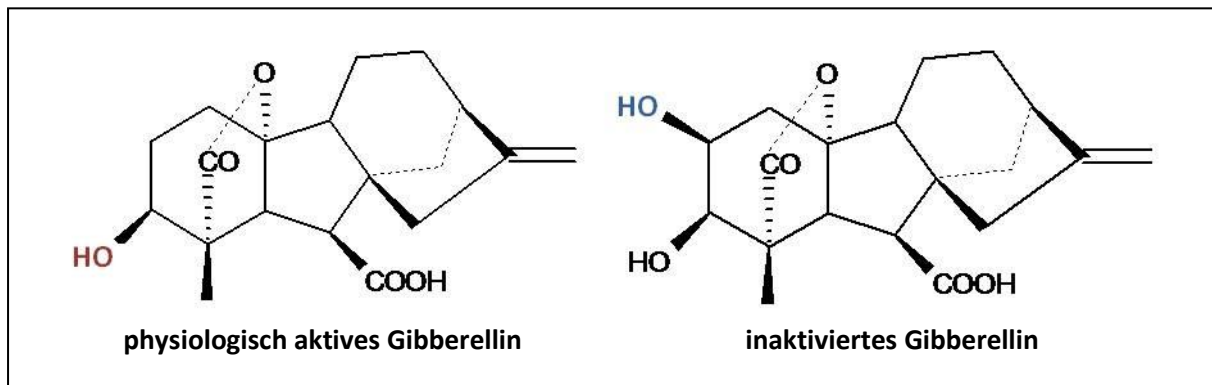


Abb. 1.2: Strukturformel von GA₄ als Beispiel eines physiologisch aktiven Gibberellins mit 3β-Hydroxylierung (rot dargestellt) und GA₃₄ als Beispiel eines inaktivierten Gibberellins durch 2β-Hydroxylierung (blau dargestellt)

1.1.1 Gibberellin-Biosynthese

In höheren Pflanzen wurden die einzelnen Synthese-Schritte ausgehend von dem Grundbaustein IPP bis zu dem inaktivierten physiologisch aktiven Gibberellin sowie der daran beteiligten Enzyme weitestgehend identifiziert und untersucht. Die Gibberellin-Biosynthese ist dabei in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert, so dass eine Unterteilung in drei Abschnitte erfolgen kann (Graebe, 1982, 1985).

Im ersten Abschnitt wird *ent*-Kauren in den Plastiden synthetisiert, welches im zweiten Abschnitt an der äußeren Plastidenmembran sowie am Endoplasmatischen Retikulum zu GA₁₂-Aldehyd oxidiert wird (Abb. 1.3). Das GA₁₂-Aldehyd dient im dritten Abschnitt schließlich zur Bildung der übrigen C₂₀- und C₁₉-Gibberelline im Cytoplasma.

Erster und zweiter Abschnitt

Im ersten Abschnitt der Gibberellin-Biosynthese erfolgt ausgehend vom Isopentenylpyrophosphat (IPP) die Bildung des *ent*-Kaurens in den Plastiden (Abb. 1.3; Aach et al. 1995, 1997; Sun & Kamiya, 1997; Helliwell et al., 2001b). In einem ersten Schritt wird durch die Geranyl-Pyrophosphat-Synthase (GPP-Synthase) die Kondensation der Isomere IPP und Dimethylallyl-Pyrophosphat zu GPP katalysiert, welches durch sukzessive Addition von zwei weiteren IPP-Einheiten zu Farnesyl-Pyrophosphat (FPP), FPP-Synthase, und schließlich zu Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP), GGPP-Synthase, umgesetzt wird (Dogbo & Camara, 1987). Dabei stammt der für die Bildung des GGPP benötigte Grundbaustein IPP größtenteils aus dem Mevanolsäure-unabhängigen Weg und wird dort aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat gebildet (Kasahara, 2002). Das gebildete GGPP wird in einem

nächsten Schritt durch die Copalyl-Pyrophosphat-Synthase (CPP-Synthase) zu CPP zyklisiert, welches als Vorstufe zur Synthese des *ent*-Kaurens durch die *ent*-Kauren-Synthase dient.

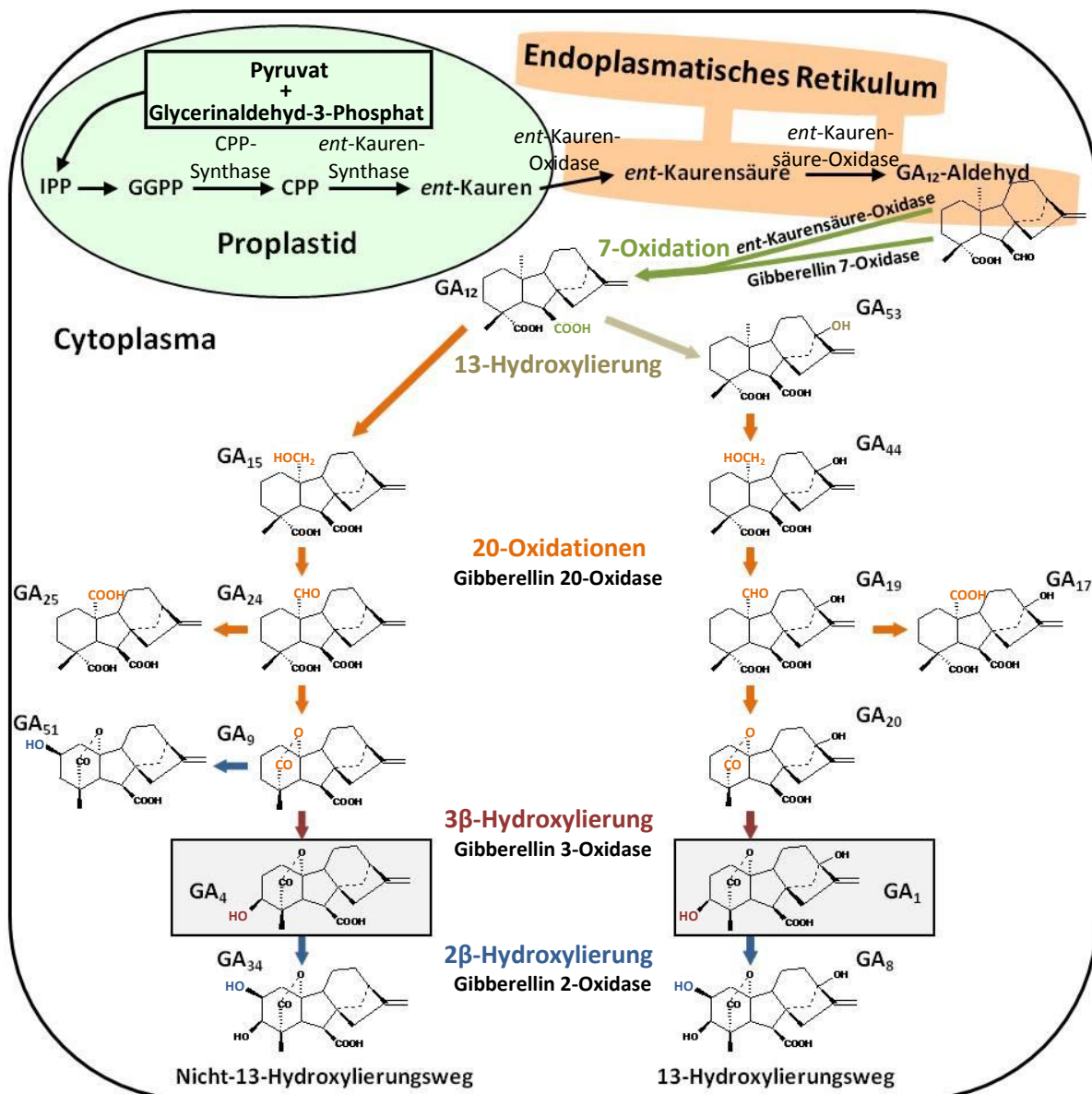


Abb. 1.3: Schematische Übersicht der drei Abschnitte der Gibberellin-Biosynthese (modifiziert nach Lange, 1998 und Yamaguchi, 2008); Im ersten Abschnitt erfolgt in den Plastiden die Synthese des *ent*-Kaurens aus IPP, im zweiten Abschnitt wird das *ent*-Kauren an der Plastidenmembran sowie am Endoplasmatischen Retikulum zu GA₁₂-Aldehyd oxidiert, im dritten Abschnitt werden die übrigen C₂₀- und C₁₉-Gibberelline im Cytoplasma aus GA₁₂-Aldehyd durch die enzymatische Aktivität von 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen synthetisiert. Dabei katalysiert die Gibberellin 7-Oxidase die Oxidation am C7-Atom zu GA₁₂, die Gibberellin 20-Oxidase die schrittweise Oxidation des C20-Atoms zu GA₉ bzw. GA₂₀, die Gibberellin 3-Oxidase die Hydroxylierung am C3-Atom in β-Konfiguration zu dem physiologisch aktiven Gibberellin A₄ bzw. GA₁ und die Gibberellin 2-Oxidase die Inaktivierung des physiologisch aktiven Gibberellins durch Hydroxylierung am C2-Atom in β-Konfiguration.

Im zweiten Abschnitt der Gibberellin-Biosynthese wird das *ent*-Kauren über mehrere Intermediate zum GA₁₂-Aldehyd oxidiert (Abb. 1.3). Dies erfolgt durch die enzymatische Aktivität von zwei NADPH-abhängigen Cytochrom P450-Monooxygenasen, die jeweils mehrere Oxidationen vollziehen. So wird das *ent*-Kauren am C19-Atom durch die *ent*-Kauren-Oxidase über die Intermediate *ent*-Kaurenol und *ent*-Kaurenal zur *ent*-Kaurensäure oxidiert (Helliwell et al., 1999). Anschließend erfolgt die Oxidation der *ent*-Kaurensäure über die *ent*-7 α -Hydroxykaurensäure zum GA₁₂-Aldehyd durch die enzymatische Aktivität der *ent*-Kaurensäure-Oxidase (Helliwell et al., 2001a). Die *ent*-Kauren-Oxidase wurde dabei in *Arabidopsis* hauptsächlich an der äußeren Membran der Plastiden und die *ent*-Kaurensäure-Oxidase am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Helliwell et al., 2001b).

Die Enzyme, die im ersten und zweiten Abschnitt der Biosynthese enzymatisch beteiligt sind, werden dabei von Genen kodiert, die im Regelfall als Einzelkopie und in einigen Ausnahmen mit mehreren Kopien im Genom vorkommen (Smith et al., 1998; Yamaguchi, 2008).

Dritter Abschnitt

Im dritten Abschnitt der Gibberellin-Biosynthese werden aus dem GA₁₂-Aldehyd die weiteren C₂₀- und C₁₉-Gibberelline durch enzymatische Aktivität von löslichen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gebildet (De Carolis & De Luca, 1994; Lange et al., 1994b). Dabei liegen diese Enzyme im Cytoplasma vor und benötigen für die Reaktionen das Cosubstrat 2-Oxoglutarat, molekularen Sauerstoff und bivalente Eisenionen.

Die Gibberellin-Biosynthese lässt sich im dritten Abschnitt in zwei Synthesewege unterteilen (Abb. 1.3). Der 13-Hydroxylierungsweg führt dabei zur Bildung des physiologisch aktiven GA₁, in Kürbissamen vorkommend, wogegen im Nicht-13-Hydroxylierungsweg das bioaktive GA₄, in Kürbissamen, Kürbiskeimlingen und Kürbisblüten vorkommend, gebildet wird (Abb. 1.3; Lange et al., 2005; Pimenta Lange & Lange, 2006; Knop, 2007).

In *Cucurbita maxima* liegt als Hauptsyntheseweg der Nicht-13-Hydroxylierungsweg vor, wobei in einem ersten Schritt das GA₁₂-Aldehyd am C7-Atom zu GA₁₂ oxidiert wird. Die 7-Oxidation wird in Kürbis entweder durch eine am Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Monooxygenase oder durch eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, die Gibberellin 7-Oxidase, katalysiert (Lange & Graebe, 1993). Das GA₁₂ wird anschließend schrittweise am C20-Atom durch die Gibberellin 20-Oxidase zu GA₁₅, Hydroxymethylgruppe am C20-Atom, und schließlich zu GA₂₄, Aldehydgruppe am C20-Atom, oxidiert. Ausgehend vom GA₂₄ können zwei Gibberelline durch die Aktivität der Gibberellin 20-Oxidase entstehen. So kann durch eine weitere Oxidation am C20-Atom das C₂₀-GA₂₅ oder durch eine oxidative Decarboxylierung das C₁₉-GA₉ gebildet werden (Lange et al., 1994a; Lange et al., 2005). Das GA₉ besitzt dabei einen γ -Lactonring zwischen dem C19- und dem C10-Atom und dient

als Vorstufe zur Bildung des physiologisch aktiven GA₄. Dazu wird das GA₉ durch die Gibberellin 3-Oxidase am C3-Atom in der β-Konfiguration hydroxyliert (Lange et al., 1997b; Frisse et al., 2003; Lange et al., 2005). Eine Inaktivierung des GA₄ erfolgt durch die Gibberellin 2-Oxidase, wobei durch eine 2β-Hydroxylierung das GA₃₄ entsteht (Frisse et al., 2003). Neben 3β-hydroxylierten Gibberellinen kann auch die Vorstufe GA₉ durch Aktivität der Gibberellin 2-Oxidasen hydroxyliert werden, wodurch GA₅₁ synthetisiert und eine Bildung physiologisch aktiver Hormone unterbunden wird.

Bei dem 13-Hydroxylierungsweg, der unter anderem in Reis dominiert, erfolgt im Gegensatz zum Nicht-13-Hydroxylierungsweg nach der Bildung des GA₁₂ eine 13-Hydroxylierung zu GA₅₃. Dies wird durch Monooxygenasen oder einer bisher unbekannten, 2-Oxoglutarat-abhängigen Gibberellin 13-Oxidase katalysiert (Hedden & Thomas, 2006; Yamaguchi, 2008). Anschließend wird entsprechend zum anderen Weg das C20-Atom schrittweise durch die Gibberellin 20-Oxidase oxidiert, wodurch über GA₄₄ und GA₁₉ das C₁₉-GA₂₀ entsteht. Durch enzymatische Aktivität der Gibberellin 3-Oxidase wird aus dem GA₂₀ das bioaktive GA₁ gebildet, welches durch die Gibberellin 2-Oxidase zu GA₈ inaktiviert werden kann.

Die löslichen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen werden von Multigenfamilien kodiert, wobei die Gene teilweise eine unterschiedliche entwicklungs- und organspezifische Expression aufweisen. So konnten im Genom von *Arabidopsis* fünf Gibberellin 20-Oxidasen, vier Gibberellin 3-Oxidasen und sieben Gibberellin 2-Oxidasen nachgewiesen werden, die während der vegetativen und generativen Entwicklung an der Gibberellin-Biosynthese beteiligt sind (Pimenta Lange & Lange, 2006; Yamaguchi, 2008).

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Kürbisart (*Cucurbita maxima* L.) sind eine Gibberellin 7-Oxidase (CmGA7ox), drei Gibberellin 20-Oxidasen (CmGA20ox1, CmGA20ox2, CmGA20ox3), drei Gibberellin 3-Oxidasen (CmGA3ox1, CmGA3ox2, CmGA3ox3) und eine funktionelle Gibberellin 2-Oxidase (CmGA2ox1) bekannt (Pimenta Lange & Lange, 2006). Die CmGA20ox1, CmGA20ox2, CmGA3ox1 und CmGA3ox2 weisen eine auf die Samenentwicklung beschränkte Expression auf (Frisse et al., 2003; Pimenta Lange & Lange, 2006), wobei durch die hohe Identität der CmGA20ox1 zur CmGA20ox2 keine spezifische Transkriptionsanalyse dieser Gene erfolgen konnte. Die CmGA7ox, CmGA20ox3, CmGA3ox3 und CmGA2ox1 sind dagegen zu diversen Zeitpunkten der vegetativen und generativen Entwicklung expremiert (Frisse et al., 2003; Fischer, 2004; Lange et al., 2005; Knop, 2007; Pimenta Lange & Lange, 2006).

Das Genom von Kürbis ist nicht bekannt, so dass ein Vorhandensein weiterer Mitglieder der Multigenfamilien nicht ausgeschlossen werden kann. So wurden im Genom der mit Kürbis nahe verwandten Gurke (*Cucumis sativus* L.) Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu den Gibberellin-Dioxygenasen identifiziert, die das Vorhandensein von zwei Gibberellin 7-Oxidasen, fünf Gibberellin 20-Oxidasen und jeweils vier Gibberellin 3-Oxidasen bzw.

Gibberellin 2-Oxidasen vermuten lassen (Huang et al., 2009). Dabei wurde die enzymatische Aktivität bisher lediglich von einigen dieser Gibberellin-Dioxygenasen überprüft und somit die Zugehörigkeit zu der jeweiligen Multigenfamilie bestätigt (Lange, unveröffentlichte Daten).

Regulation der Gibberellin-Biosynthese

Die Gibberellin-Biosynthese wird in Pflanzen durch verschiedene endogene und exogene Faktoren reguliert, die meist einen Einfluss auf die Gibberellin-Dioxygenasen besitzen. So wird die Transkription der Gibberellin-Dioxygenase-Gene durch entwicklungsspezifische Faktoren (Sakamoto, 2001; Hay, 2002; Hedden & Thomas, 2006), durch exogene Reize wie Licht oder Temperatur (García-Martínez & Gil, 2002; Oh et al., 2006; Yamaguchi et al., 2004; Penfield et al., 2005) und durch den endogenen Hormonhaushalt (Hedden & Phillips, 2000; Olszewski et al., 2002; Hedden & Thomas, 2006; Yamaguchi, 2008) beeinflusst (Abb. 1.4).

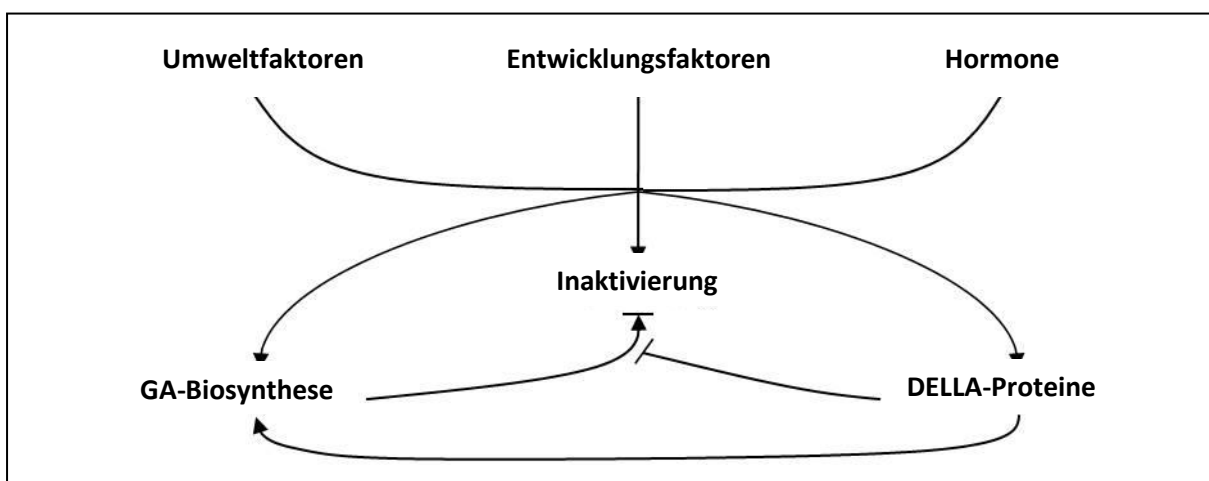


Abb. 1.4: Regulation der Gibberellin-Biosynthese durch Umweltfaktoren, Entwicklungsfaktoren und Phytohormone (nach Hedden & Thomas, 2006)

Neben den anderen Phytohormonen wird dabei die Gibberellin-Biosynthese auch von dem endogenen Gibberellin-Gehalt selbst reguliert (Abb. 1.5). In GA-defizienten Pflanzen wurde eine zu dem Wildtyp abweichende Transkription der Gibberellin-Dioxygenasen beobachtet, wobei die Transkriptgehalte der Gibberellin 20-Oxidasen sowie der Gibberellin 3-Oxidasen erhöht und die der Gibberellin 2-Oxidasen reduziert sind (Carrera et al., 1999; Rieu et al., 2008a; Lange et al., 2005; Matsushita et al., 2007; Carzoli et al., 2009). Dagegen weisen Pflanzen nach exogener Applikation von physiologisch aktiven Gibberellin ein gegenteiliges Expressionsmuster auf (Phillips et al., 1995; Carrera et al., 1999; Matsushita et al., 2007; Rieu et al., 2008b).

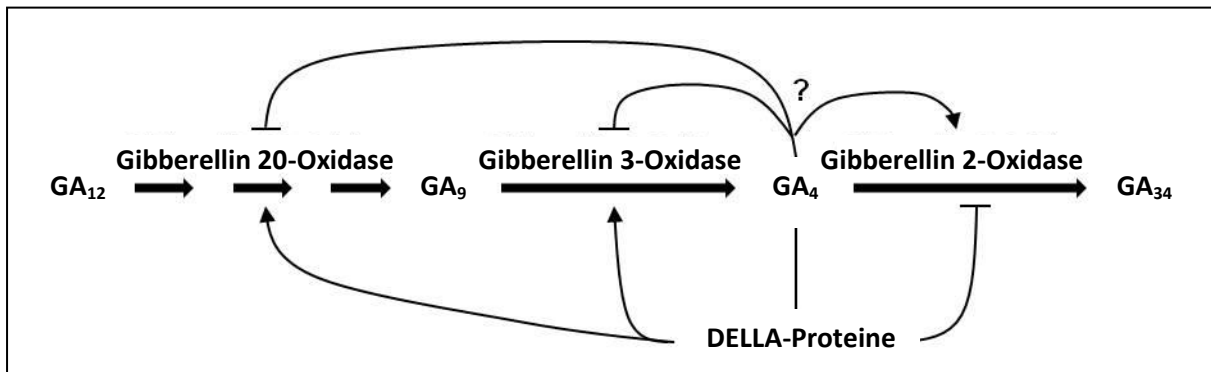


Abb. 1.5: Regulation der Expression der Gibberellin-Dioxygenasen durch den endogenen Gibberellin-Gehalt

Die molekularen Mechanismen der Gibberellin-Homöostase sind dabei größtenteils unbekannt, scheinen in einigen Fällen aber von der Gibberellin-Signaltransduktion abzuhängen. So besitzen Reis- und Arabidopsispflanzen mit Mutationen in den DELLA-Genen, die für Repressoren der Gibberellin-Antwort kodieren, im Vergleich zum Wildtyp verringerte Transkriptgehalte der Gibberellin 20-Oxidasen und Gibberellin 3-Oxidasen (Sun & Gubler, 2004).

In Tabak wurde dagegen ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der in Abhängigkeit von dem endogenen Gibberellin-Gehalt die Transkription der Gibberellin 20-Oxidase direkt beeinflusst (Igarashi et al., 2001; Ishida et al., 2004; Ishida et al., 2008). Das Protein REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG) wird negativ von 14-3-3 Proteinen reguliert, wobei die Lokalisierung in der Zelle von dem endogenen Gibberellin-Gehalt abhängt. So liegt RSG bei einem hohen endogenen Gibberellin-Gehalt im Cytoplasma und bei einem geringen endogenen Gibberellin-Gehalt im Nukleus vor. Der Transkriptionsfaktor bindet dabei direkt an den Promotor der Gibberellin 20-Oxidase und führt somit zu einer erhöhten Transkription bei einem geringen endogenen Gibberellin-Gehalt (Fukazawa et al., 2010).

1.1.2 Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion

Bestandteile der Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion und deren regulatorischer Einfluss auf das Gibberellin-vermittelte Wachstum wurden in vielen höheren Pflanzen nachgewiesen und charakterisiert. Dabei wurden sowohl negative Regulatoren (DELLA-Proteine) als auch positive Regulatoren (F-Box-Proteine und GID1) der Gibberellin-Antwort identifiziert.

DELLA-Proteine

Für die im Nukleus lokalisierten DELLA-Proteine wurde ein regulatorischer Einfluss auf das Gibberellin-vermittelte Wachstum von Pflanzen beobachtet (Silverstone et al., 1998; Dill & Sun, 2001; King et al., 2001). So besitzen Reispflanzen mit einer Mutation des DELLA-Gens *SLENDER1* (*SLR1*) eine zur exogenen Behandlung mit bioaktiven Gibberellin vergleichbare Erhöhung der Internodienstreckung, welche nicht durch Behandlung mit einem Inhibitor der Gibberellin-Biosynthese beeinflussbar ist (Ikeda et al., 2001). Des Weiteren weisen GA-defiziente Arabidopsispflanzen ein zum Wildtyp analoges Wachstum in Abwesenheit der DELLA-Proteine auf (Dill & Sun, 2001; King et al., 2001; Tyler et al., 2004). Die DELLA-Proteine wirken somit als Repressoren der Gibberellin-abhängigen Entwicklung in Pflanzen, wobei der Abbau der DELLA-Proteine durch Gibberellin induziert wird (Silverstone et al., 2001).

Die DELLA-Proteine gehören zu der GRAS-Familie und bestehen aus mehreren funktionell wichtigen Domänen (Itoh et al., 2002; Hartweck, 2008). Die in der Proteinfamilie konservierte GRAS-Domäne liegt dabei am C-Terminus des Proteins vor und ist an der Bindung zu den F-Box-Proteinen beteiligt (Dill et al., 2004). Am N-Terminus befindet sich die DELLA-Domäne, die aus 27 Aminosäuren besteht, wovon die ersten 5 Aminosäuren für die Domäne und die Proteine namensgebend sind. Zusammen mit der benachbarten TVHNYP-Domäne vermittelt die DELLA-Domäne die Interaktion des Repressors mit dem Gibberellin-Rezeptor (Itoh et al., 2002; Willige et al., 2007; Griffiths et al., 2006).

In Arabidopsis wurden fünf DELLA-Proteine, GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 und RGL3, identifiziert (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Lee et al., 2002; Wen & Chang, 2002), die eine regulatorische Funktion auf unterschiedliche Entwicklungen der Pflanze besitzen (Dill & Sun, 2001; King et al., 2001; Lee et al., 2002; Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004).

In Kürbis konnten bisher zwei DELLAs identifiziert werden (Haywood et al., 2005, CmGAIP = CmGAIPa, CmGAIP-B = CmGAIPb), wobei die kodierenden Bereiche des *CmGAIPa* und *CmGAIPb* eine hohe Identität von 88% aufweisen. Untersuchungen zeigten, dass die DELLAs sowohl während der Samenentwicklung als auch während der Entwicklung männlicher Blüten in der Kürbispflanze expremiert sind (Frenzel, 2009; Lange, unveröffentlichte Daten).

In dem Genom der mit Kürbis nahe verwandten Art *Cucumis sativus* wurden vier DELLA-Homologe identifiziert (Huang et al., 2009), so dass auch das Vorhandensein weiterer DELLAs in Kürbis wahrscheinlich ist.

F-Box-Proteine

In Arabidopsis und Reis wurden Proteine identifiziert, die an einer positiven Regulation des Gibberellin-Signals beteiligt sind. Dabei besitzen GIBBERELLIN INSENSITIVE2 (GID2) aus Reis und SLEEPY (SLY) aus Arabidopsis ein F-Box Motiv am N-Terminus und sind Untereinheiten des SCF (Skp1/cullin/F-box) E3 Ligase-Komplex (McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003). Dieser Komplex bindet an die DELLA-Proteine und führt zu deren Ubiquitinierung und somit zur Degradation durch das 26S Proteasom.

In Kürbis wurden jedoch bisher keine F-Box-Proteine identifiziert.

Gibberellin-Rezeptor

In Reis wurde bei der Mutante *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* (*GID1*) ein GA-defizienter Phänotyp beobachtet, der nicht durch die exogene Applikation von bioaktiven Gibberellin beeinflussbar ist (Uegushi-Tanaka et al., 2005). Biochemische und genetische Untersuchungen zeigten, dass dieses Gen für ein Protein mit hoher Ähnlichkeit zu Hormonsensitiven Lipasen kodiert, welches löslich im Nukleus vorkommt und die Funktion eines Rezeptors besitzt (Ueguchi-Tanaka et al., 2005, 2007).

So wurde die Interaktion von Gibberellinen mit dem GID1-Protein nachgewiesen, wobei physiologisch aktives Gibberellin eine höhere Affinität als die inaktiven Gibberelline besitzt. Die Tertiärstruktur des GID1-Protein bildet dabei eine Bindungstasche aus, in die das Gibberellin unter anderem mit der Carboxylgruppe am C6-Atom sowie der Hydroxylgruppe am C3-Atom, charakteristische Gruppen der physiologisch aktiven Gibberelline, über Wasserstoffbrückenbindungen bindet (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008). Das *ent*-Gibberellin-Grundgerüst des gebundenen Gibberellins interagiert mit dem N-terminalen Ende des Rezeptors, wodurch eine Konformationsänderung des Rezeptors ausgelöst wird. Des Weiteren wurde ein Gibberellin-abhängiger Kontakt zwischen dem DELLA und dem Rezeptor nachgewiesen, wobei die DELLA- und TVHYNP-Domäne mit dem N-terminalen Strang des GID1, nach der Konformationsänderung, interagiert (Murase et al., 2008).

Homologe des Gibberellin-Rezeptors aus Reis konnten in vielen höheren Pflanzen isoliert werden, wobei häufig mehrere Kopien im Genom identifiziert wurden. So wurden in Arabidopsis drei und in Kürbis sowie in der mit Kürbis nahe verwandten Gurke zwei Gibberellin-Rezeptoren nachgewiesen (Nakajima et al., 2006; Kufka, 2007; Huang et al., 2009). Dabei ist im Kürbissamen *CmGID1a* vorwiegend in der Samenschale und *CmGID1b* im Endosperm und im Embryo expremiert (Lange, unveröffentlichte Daten).

Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion

Zum heutigen Zeitpunkt ist der in Abbildung 1.6 dargestellte Mechanismus der Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion bekannt.

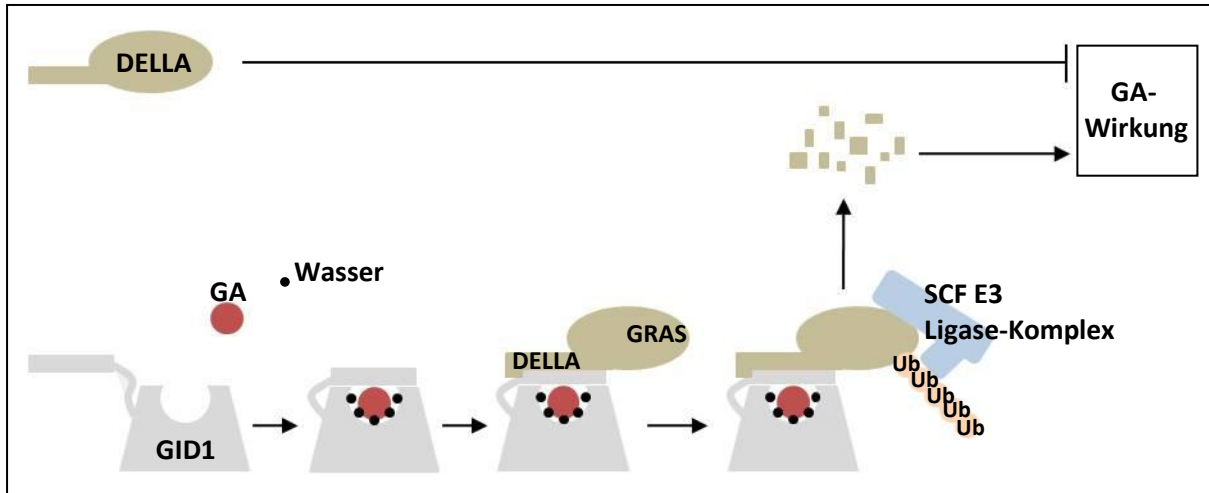


Abb. 1.6: Übersicht über die Gibberellin-Signaltransduktion (modifiziert nach Murase et al., 2008); Gibberellin bindet an den Gibberellin-Rezeptor GID1, wodurch eine Konformationsänderung eintritt und die DELLA-Proteine an der DELLA- und TVHYNP-Domäne gebunden werden. Die als Repressoren der Gibberellin-vermittelten Entwicklung fungierenden DELLA-Proteine werden anschließend von dem SCF E3 Ligase-Komplex polyubiquitiniert und durch das 26S Proteasom degradiert, wodurch die Gibberellin-Wirkung eintreten kann.

Der Gibberellin-Rezeptor besitzt eine Bindungstasche, in die das physiologisch aktive Gibberelline über Wasserstoffbrückenbindungen bindet. Dabei liegen die für die bioaktiven Gibberelline charakteristische und für die Bindung an den Rezeptor wichtige Hydroxylgruppe des C3-Atoms sowie Carboxylgruppe des C6-Atoms innerhalb dieser Bindungstasche. Die Interaktion der Oberfläche des gebundenen Gibberellins mit einem beweglichen Strang des Rezeptor-Proteins am N-Terminus führt dabei zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Durch diese Konformationsänderung wird die Interaktion mit der DELLA- und TVHYNP-Domäne des DELLA-Proteins ermöglicht, wodurch die Affinität zu dem SCF E3 Ubiquitin-Ligase-Komplex erhöht wird. Dieser Komplex bindet über die F-Box-Proteine an die GRAS-Domäne des DELLA-Proteins, wodurch das DELLA-Protein ubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut wird.

Die DELLA-Proteine fungieren dabei als Repressoren der Gibberellin-vermittelten Entwicklung. In Anwesenheit von Gibberellin werden diese somit abgebaut, wodurch die Transkription bestimmter Gene und damit die Gibberellin-vermittelte Antwort ermöglicht wird.

1.1.3 Gibberellin-Wirkung

Die Morphogenese sowie das Wachstum werden in höheren Pflanzen durch eine komplexe Interaktion der verschiedenen Pflanzenhormone reguliert (Fleet & Sun, 2005; Wang & Li, 2008; Benková & Hejátko, 2009; Galinha et al., 2009; Ubeda-Tomas & Bennett, 2010). Dabei weisen GA-defiziente Pflanzen neben einen zwergwüchsigen Phänotyp meist auch eine abweichende Entwicklung der Blüten auf (Koorneef & van der Veen, 1980; Cosgrove & Suvonick-Dunford, 1989; Jacobsen & Olszewski, 1991; van den Heuvel et al., 2001; Yaxley et al., 2001; Fu & Harberd, 2003; Cheng et al., 2004; Yu et al., 2004; Rieu et al., 2008a). So besitzen unter anderen *ga1-3* Arabidopsispflanzen, Mutation in der GA-Biosynthese, ein reduziertes Wachstum des Hypokotyls, der Internodien, der Blätter, der Wurzel und der Blütenorgane (Koorneef & van der Veen, 1980; Fu & Harberd, 2003; Cheng et al., 2004; Yu et al., 2004). Durch Applikation von exogenen physiologisch aktiven Gibberellin bzw. bei einer zusätzlich vorhandenen Mutation der Repressoren der Gibberellin-Antwort liegt dagegen eine zum Wildtyp entsprechende Entwicklung der vegetativen und reproduktiven Organe vor (Koorneef & van der Veen, 1980; Fu & Harberd, 2003; Cheng et al., 2004; Yu et al., 2004; Griffiths et al., 2006). Auch eine Mutation in den Gibberellin-Rezeptoren führt in Arabidopsis zu einer abweichenden Entwicklung der Wurzel, des Sprosses sowie der Blüten (Griffiths et al., 2006). Die Entwicklung der Organe ist somit von Gibberellin über den in *Arabidopsis* bekannten Signalweg abhängig.

In Arabidopsispflanzen konnte dabei der Einfluss des Gibberellins auf die Zellelongation im Hypokotyl, in den Filamenten sowie der Wurzel nachgewiesen werden (Cowling & Harberd, 1999; Cheng et al., 2004; Derbyshire et al., 2007; Ubeda-Tomás et al., 2008), wobei in der Wurzel zusätzlich eine Veränderung der Zellteilungsrate beobachtet wurde (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2009).

1.2 Virus induziertes Gen-Silencing (VIGS)

Das Virus induzierte Gen-Silencing (VIGS) ermöglicht die Untersuchung der Genfunktion in Pflanzen, bei denen eine stabile Transformation nicht möglich oder schwer erreichbar ist. Dazu werden rekombinante Viren (Kap. 1.2.1) mit einem Fragment des zu untersuchenden Gens in die Pflanze injiziert, wodurch eine spezifische Reduktion der endogenen Genaktivität erzeugt wird. Der Abbau der Wirtstranskripte basiert dabei auf einen durch virale Infizierung induzierten Abwehrmechanismus der Pflanzen, der als Post-Transkriptionales Gen-Silencing (PTGS) bezeichnet wird (Kap. 1.2.2).

In der Regel werden die zu untersuchenden Pflanzenstadien direkt infiziert, wodurch das VIGS eine zeitsparende Methode ist und auch im Gegensatz zu vielen anderen Systemen eine Untersuchung embryotetaler Gene ermöglicht. Jedoch werden durch das PTGS die Transkripte der Pflanze nicht vollständig zerstört und in einigen Fällen tritt keine uniforme Verbreitung bzw. Gen-Silencing in der infizierten Pflanze auf, so dass nicht immer ein abweichender Phänotyp ausgebildet wird.

Zur Etablierung des Systems in einer Pflanzenart wird daher häufig ein Gen verwendet, das bei einem erfolgreichen Gen-Silencing zur Ausbildung eines sichtbar veränderten Phänotyps führt. Meist dient dazu ein Fragment der *Phytoene-Desaturase* (*PDS*), kodierend für ein an der Carotenoid-Biosynthese beteiligten Enzym. Das Gen-Silencing des *PDS* resultiert dabei durch Reduktion der Carotenoide in der Photooxidation des Chlorophylls, wodurch die Pflanze einen gebleichten Phänotyp ausbildet (Kumagai et al., 1995).

Dabei wird die Effizienz des VIGS von verschiedenen Faktoren wie der Infizierungsmethode (Brigneti et al., 2004; Ryu et al., 2004; Orzaez et al., 2006), dem Alter der infizierten Pflanzen (Robertson, 2004; Brigneti et al., 2004; Burch-Smith et al., 2006) sowie den Kultivierungsbedingungen (Burch-Smith et al., 2004; Brigneti et al., 2004; Fu et al., 2006; Shao et al., 2008) beeinflusst, die je nach verwendeter Pflanzenart variieren.

1.2.1 virale Vektoren

Zum heutigen Zeitpunkt wurden viele virale Vektoren entwickelt, die jedoch jeweils nur ein Gen-Silencing in einer begrenzten Anzahl von Pflanzenarten erlauben (Purkayastha & Dasgupta, 2009; Unver & Budak, 2009). Alle Vektoren besitzen dabei die für die Infizierung der Pflanzen und zum Auslösen des PTGS wichtigen funktionellen Teile des viralen Genoms. Zusätzlich enthalten sie einen Bereich, der eine Insertion eines Fragments des zu untersuchenden Gens erlaubt, der meist aus einem Polylinker besteht. Das eingefügte Genfragment sollte dabei möglichst den mittleren Bereich des Transkripts (Liu & Page, 2008) sowie eine 100%ige Sequenzhomologie zu dem zu untersuchenden Gen besitzen und mindestens 23 bp umfassen (Thomas et al., 2001). Für die Erstellung der rekombinanten Vektoren wird jedoch meist ein größeres Fragment verwendet, das in der Regel zwischen 200 und 1300 bp lang ist (Liu & Page, 2008).

Oft werden VIGS-Systeme verwendet, die auf Ti-Plasmiden beruhen und somit die Transformation der Pflanzen über Agrobakterium vermittelten Gentransfer ermöglichen. Dazu zählen die binären Vektorsysteme, die unter anderen auf den Potato Virus X (PVX), Tobacco Mosaic Virus (TMV) bzw. Tobacco Rattle Virus (TRV) basieren (Unver & Budak,

2009). Jedoch führt auch die direkte Infizierung mit Plasmiden, wie bei dem Apple Latent Spherical Virus-Vektor (ALSV-Vektoren), zu einer erfolgreichen Transformation der Pflanzen (Igarashi et al., 2009).

TRV

Der zur Gattung *Tobravirus* gehörende Tobacco Rattle Virus (TRV) ist ein zweiteiliger Pflanzenvirus, dessen Genom aus einzelsträngiger RNA mit Plusstrang-Polarität besteht (MacFarlane, 1999, 2010). Bei der Erzeugung des binären Vektorsystems wurde dabei das cDNA-Fragment der RNA1 bzw. der RNA2 in ein Ti-Plasmid kloniert, wobei ein doppelter CaMV35S Promotor und ein Terminator eingefügt wurden (Liu et al., 2002a). Die RNA1 kodiert dabei für Proteine zuständig für die Replikation und Verbreitung in der Pflanze und die RNA2 für Proteine für die Bildung der Virione (Abb. 1.7). In den pTRV2 liegt dabei zusätzlich ein DNA-Polylinker vor, der ein gerichtetes Klonieren von DNA-Fragmenten der zu untersuchenden Gene erlaubt.

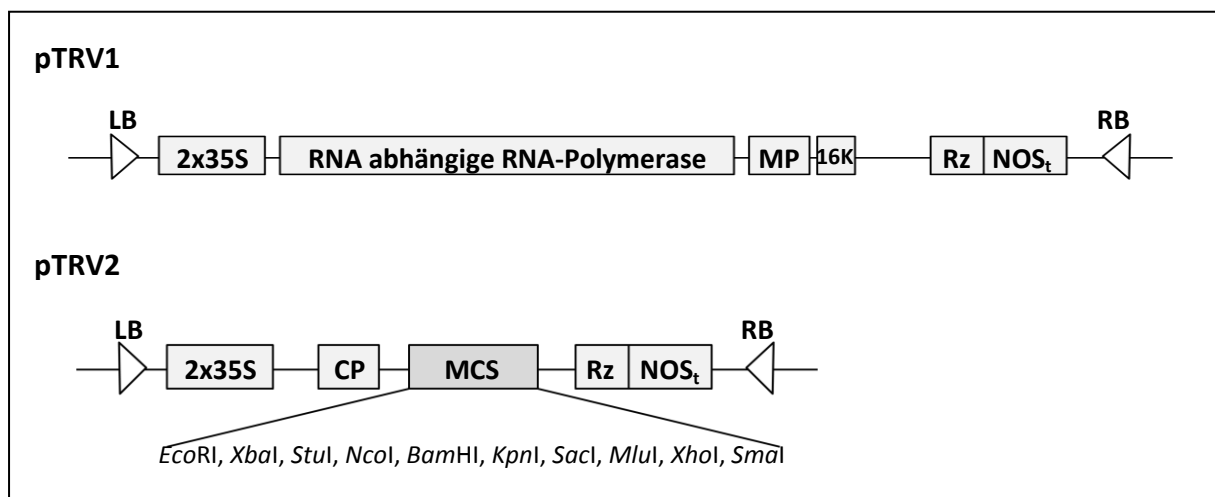


Abb. 1.7: Virale Vektoren des auf den Tobacco Rattle Virus (TRV) basierenden Virus induzierten Gen-Silencing-Systems (Liu et al., 2002b); pTRV1 und pTRV2 basieren auf Ti-Plasmiden mit einem doppelten 35S-Promotor, einem Ribozym (Rz) und einem Terminator (NOS_t). Das pTRV1 kodiert für eine RNA abhängige RNA-Polymerase und für das beim Transport benötigte Protein (MP). In den pTRV2 liegt neben der Sequenz des an der Bildung der Virionenhülle beteiligten Proteins (CP) auch ein DNA-Polylinker (Multi Cloning Site: MCS) zur Insertion eines DNA-Fragments des zu untersuchenden Gens vor.

Mit dem TRV-System konnte ein effizientes Gen-Silencing in Mitgliedern der Familien *Solanaceae* (Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002a; Liu et al., 2002b; Brigneti et al., 2004; Chen et al., 2004; Chung et al., 2004) und *Papaveraceae* (Hileman et al., 2005; Orashakova et al., 2009) sowie in *Arabidopsis* (Burch-Smith et al., 2006) und *Aquilegia vulgaris* (Gould &

Kramer, 2007) erzielt werden. Neben dem großen Wirtsspektrum besitzt das TRV-System weitere Vorteile. So verbreitet sich das Virus bis in die meristematischen Gewebe und die durch den Virus ausgelösten Krankheitssymptome sind mild, wodurch nahezu keine Beeinträchtigung der Untersuchung erfolgt.

1.2.2 Mechanismus des VIGS

Zum Virus induzierten Gen-Silencing (VIGS) wird meist ein binäres Vektorsystem verwendet, welches auf Ti-Plasmiden beruht (Lee & Gelvin, 2008) und somit die Transformation der Pflanzen über Agrobakterium vermittelten Gentransfer ermöglicht (Tzfira & Citovsky, 2006). Dazu wird der Pflanze ein Gemisch der in Agrobakterien vorliegenden viralen Vektoren injiziert. Nach der Integration in die Wirtszelle wird die T-DNA transkribiert sowie translatiert und die Virione gebildet, welche weitere Zellen des Wirtes infizieren (Abb. 1.8).

Daneben dient die einzelsträngige RNA des Virus zur Erzeugung von doppelsträngiger RNA (dsRNA), wodurch ein als Post-Transkriptionales Gen-Silencing (PTGS) bezeichneter Abwehrmechanismus in den Pflanzen ausgelöst wird. Die Synthese der dsRNA erfolgt durch die im Vektor kodierte RNA-abhängige RNA-Polymerase (RRP) und wird von in den Pflanzen vorkommenden Proteinen, DICER-LIKE (DCL), erkannt, gebunden und in 21 – 24 nt große Fragmente zerschnitten (Hammond, 2005; Donaire et al., 2008).

Diese Fragmente (short interfering RNA: siRNA) können sowohl als Primer zur Polymerisierung von dsRNA in 3'→5'- und 5'→3'-Richtung durch die im Wirtsgenom kodierte RRP als auch als Erkennungssequenz zur Zerstörung von komplementärer RNA dienen (Benedito et al., 2004). Dazu wird die siRNA von dem RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISK) gebunden, entwunden und die einzelsträngige siRNA als Template zur Erkennung, Bindung sowie Zerstörung komplementärer RNA verwendet (Benedito et al., 2004; Hammond, 2005).

Durch das in den pRNA2 integrierten Fragments wird dabei spezifisch post-transkriptional die Aktivität des zu untersuchenden Gens durch Abbau der Transkripte reduziert, wodurch die Translation unterbunden und die Funktion der Gene durch eine Änderung des Phänotyps bestimmt werden kann.

Das Gen-Silencing wird in den Pflanzen unabhängig von den Virionen auch durch sogenannte Silencing-Signale über die Plasmodesmata und dem Leitsystem verbreitet. Dabei dienen die durch die DCL gebildeten siRNAs zur Ausbreitung über die angrenzenden 10-15 Zellen (Himber et al., 2003; Dunoyer et al., 2005; Kalantadis et al., 2008).

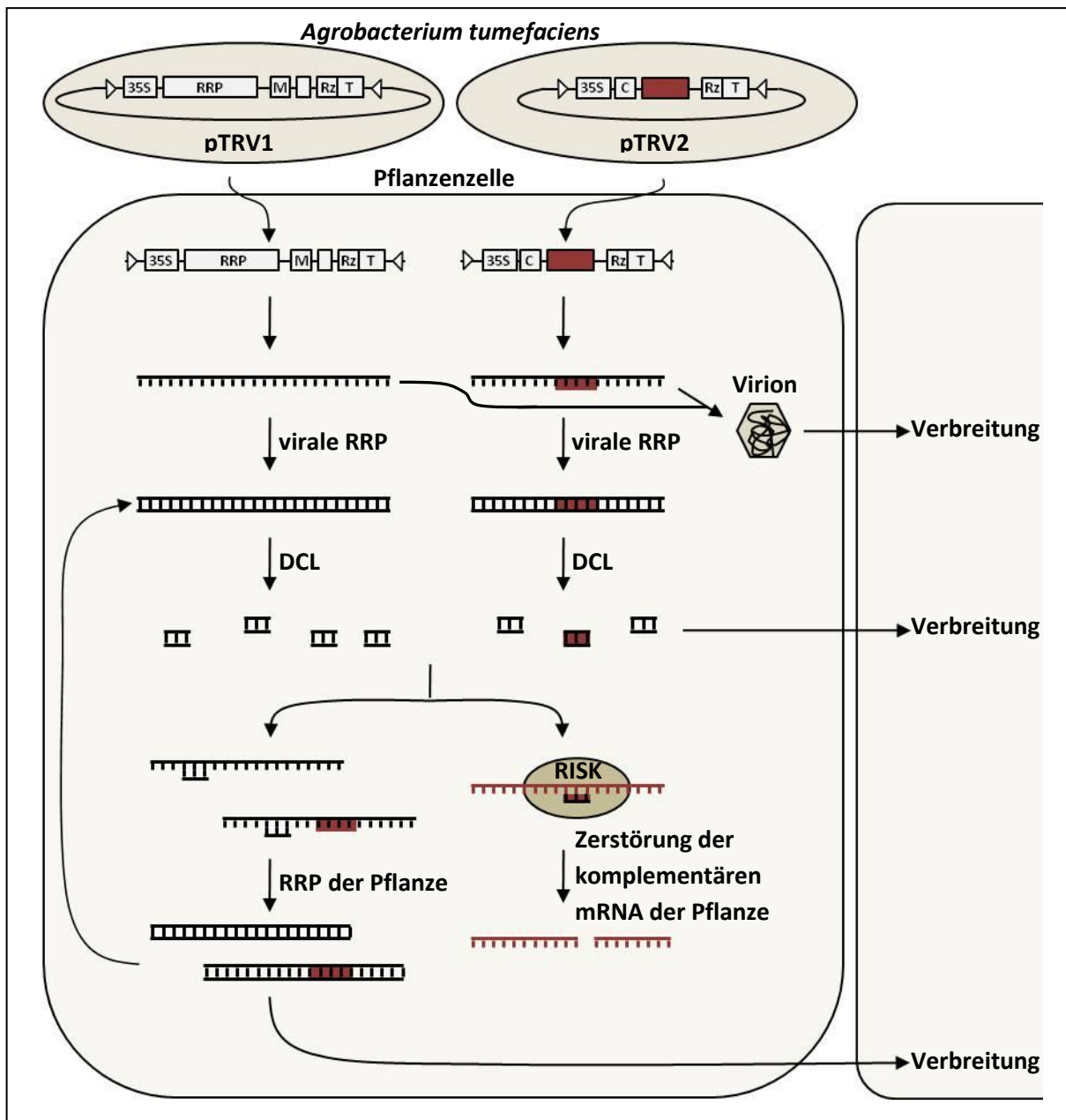


Abb. 1.8: Mechanismus des Virus induzierten Gen-Silencings in höheren Pflanzen am Beispiel des auf den Tobacco Rattle Virus (TRV) basierenden Systems (modifiziert nach Benedito et al., 2004); Nach der Injektion der Agrobakterien wird die T-DNA in die Pflanzenzellen integriert, transkribiert, translatiert und die Virione gebildet. Außerdem wird die virale RNA von der RNA abhängigen RNA-Polymerase (RRP) als Template zur Synthese doppelsträngiger RNA verwendet, welche von DICER-LIKE (DCL) Proteinen erkannt und in 21 - 24 nt große Fragmente zerschnitten wird. Diese Fragmente dienen als Primer zur Amplifizierung von doppelsträngiger RNA oder zur Erkennung und Zerstörung komplementärer RNA durch den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISK). Dabei werden durch das in den pTRV2 integrierten Fragment (rot dargestellt) spezifisch die Transkripte des zu untersuchenden Gens der Pflanze abgebaut. Die Verbreitung des Gen-Silencing in der Pflanze erfolgt neben der Infizierung von Zellen durch die Virione auch durch den Transport der doppelsträngigen RNA.

Die systemische Verbreitung scheint im Zusammenhang mit der Aktivität der im Pflanzengenom kodierten RRP zu liegen, womit die gebildeten langen dsRNA für einen Langstreckentransport fungieren könnten (Kalantadis et al., 2008).

1.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gibberellin-Signalwege, bestehend aus Gibberellin-Biosynthese, Gibberellin-Perzeption sowie Gibberellin-Signaltransduktion, in Kürbis (*Cucurbita maxima* L.) während bedeutender Schritte der vegetativen und reproduktiven Entwicklung aufgeklärt.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass wichtige Enzyme, die an der Bildung sowie Deaktivierung des physiologisch aktiven Gibberellins beteiligt sind, in Keimlingswurzeln und den Organen männlicher Blüten unbekannt sind (Lange et al., 2005; Knop, 2007). Daher wurden zu einer vollständigen Aufklärung der einzelnen Gibberellin-Biosyntheseschritte bisher unbekannte 2-Oxoglutarat-abhängige Gibberellin-Dioxygenasen in 7 Tage alten Kürbiswurzeln identifiziert und charakterisiert.

Die Transkriptgehalte der neu identifizierten sowie teilweise der bereits bekannten Gibberellin-Dioxygenase-, der Gibberellin-Rezeptor- und der Gibberellin-Repressor-Gene wurden mittels kompetitiver Reverser Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion spezifisch in den einzelnen Organen während der Keimlings- und männlichen Blütenentwicklung quantifiziert. Zusammen mit den bereits in den Keimlingsorganen bekannten (Lange et al., 2005) sowie in den Blütenorganen ermittelten endogenen Gibberellin-Gehalten sollte dies zur näheren Lokalisierung der Biosynthese sowie der Gibberellin-Wirkung dienen.

Des Weiteren wurde die Wirkung des aktiven Gibberellins auf die vegetative und besonders auf die reproduktive Entwicklung untersucht. Dazu wurden zum einen die Kürbispflanzen mit einem Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese behandelt, um durch den erzeugten GA-defizienten Phänotyp Aufschluss auf den Einfluss zu erlangen. Zum anderen sollte die exakte Funktion der Mitglieder der an den Gibberellin-Signalwegen beteiligten Multigenfamilien durch Etablierung eines zu einer stabilen Transformation alternativen Systems ermittelt werden. Dazu wurde ein auf den Tobacco Rattle Virus basierendes VIGS-System verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Es wurden die zur Familie der *Cucurbitaceae* gehörenden monözischen Pflanzen *Cucurbita maxima* L. var. „Riesenmelone, gelb genetzt“ und *Cucumis sativus* L. var. Hokus verwendet. Dabei wurde das Saatgut der Kürbispflanze vom Samenhaus Knieke in Braunschweig und der Gurkenpflanze vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung aus Gatersleben bezogen.

2.1.1 Pflanzenanzucht

Die Samen wurden zwei Stunden bei 24°C in der bei der Anzucht verwendeten Gießlösung gequollen. Anschließend wurde je ein Samen in einen mit Vermiculite (Zusammensetzung s. Seite 21) gefüllten Plastiktopf (100 ml) gesteckt. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer (s. Seite 21) im Tag-Nacht-Rhythmus von 18 h Licht bei 24°C und 6 h Dunkelheit bei 18°C kultiviert. Dabei wurden die Pflanzen entweder mit Leitungswasser, mit einer 10⁻⁵M LAB 150 978-Lösung, mit einer 10⁻⁴M LAB 150 978-Lösung bzw. mit einer 10⁻⁶M GA₄-Lösung gegossen. Die für das Ansetzen der Gießlösung benutzten Stammlösungen des LAB 150 978 bzw. des GA₄ wurden in Methanol angesetzt, so dass in den verwendeten Gießlösungen eine Methanolkonzentration von 0,1% vorlag. Um eine Beeinflussung der Daten durch das Zellgift Methanol vorzubeugen, wurde für die Kontrollbehandlung des Versuchs Leitungswasser mit einer entsprechenden Methanolkonzentration verwendet.

Nach 7 Tagen wurden die für eine Infektion mit den viralen Vektoren verwendeten Keimlinge und nach 14 Tagen die zur Untersuchung von Blüten verwendeten Keimlinge in mit COMPO® Compo Sana® Balkon- und Kübelpflanzenerde (Zusammensetzung s. Seite 21) gefüllte größere Plastiktöpfe (500 ml) umgetopft. Dabei wurden die mit viralen Vektoren infizierten Pflanzen teilweise im Tag-Nacht-Rhythmus von 18 h Licht bei 20°C – 22°C und 6 h Dunkelheit bei 18°C kultiviert. Des Weiteren erfolgte ab einem Alter von 14 Tagen jeden

zweiten Tag ein Besprühen der mit LAB 150 978 gegossenen Pflanzen mit einer 10^{-4} M LAB 150 978-Lösung (0,5% Tween 20).

Zusammensetzung des Vermiculites

Das verwendete Vermiculite wurde von der Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH bezogen und bestand aus einem Aluminium-Eisen-Magnesium-Silikat der Körnung 3 – 6 mm.

Zusammensetzung der Pflanzenerde

Die verwendete Pflanzenerde COMPO® Compo Sana® Balkon- und Kübelpflanzenerde war nach Herstellerangaben wie folgt zusammengesetzt:

Komponenten:	92% Hochmoortorf
	5% Grünkompost
	3% Perlite
	AGRISOL®, Seevogelguano, Kalk
Verfügbare Nährstoffe:	200 – 450 mg/l Stickstoff
	200 – 400 mg/l P_2O_5
	300 – 500 mg/l K_2O
pH-Wert:	5,6 – 6,5
Salzgehalt:	1 – 2 g/l

Verwendete Klimakammer

Zur Pflanzenanzucht wurde folgende Klimakammer verwendet:

Maße:	2,3 m x 1 m x 2 m (Länge x Breite x Höhe)
Beleuchtung:	Osram Powerstar HQI/T 400W/D Daylight-Lampe mit einer mittleren Lichtintensität von $200 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

2.1.2 Ernte des Pflanzenmaterials

Es wurden unterschiedliche Stadien der Keimlings- und Blütenentwicklung von *Cucurbita maxima* geerntet. Für die Untersuchung der Gibberellin-Biosynthese in Keimlingen wurden 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alte Keimlinge benutzt (Abb. 2.1). Die 5 Tage und 7 Tage alten Keimlinge wurden dabei bei der Ernte in Sprossspitze (Apikalmeristem, Blattansatz), Kotyledonen, Hypokotyl, Wurzelrest und Wurzelspitze (Primärwurzel und Seitenwurzeln, ca. 0,5 - 1 mm) unterteilt. Die Sprossspitze 3 Tage alter Keimlinge war noch nicht sichtbar,

weswegen eine Unterteilung in Kotyledonen, Hypokotyl, Wurzelrest und Wurzelspitze erfolgte. Dabei enthielten die Kotyledonen die gering ausgebildete Sprossspitze.

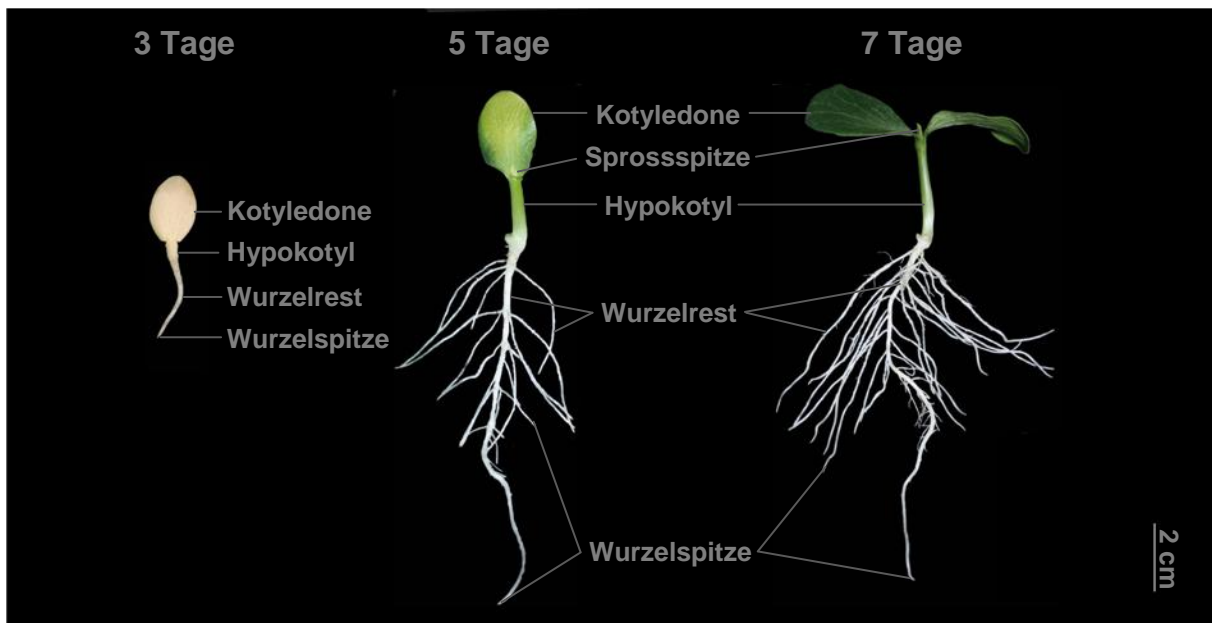


Abb. 2.1: Übersicht über die geernteten Organe der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.)

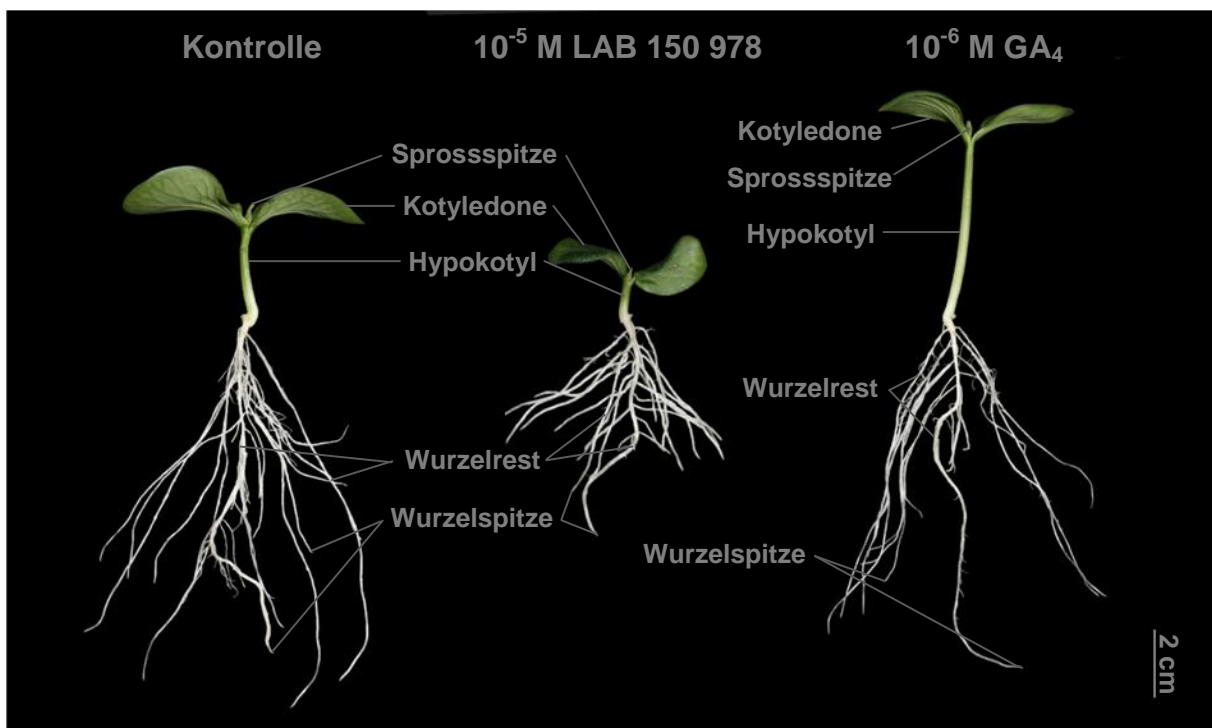


Abb. 2.2: Übersicht über die geernteten Organe der mit Leitungswasser (0,1% Methanol), mit 10^{-5} M LAB 150 978 und mit 10^{-6} M GA_4 behandelten 7 Tage alten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.)

Für die Untersuchung des Gibberellin-Gehalts auf die Genexpression wurden 7 Tage mit Leitungswasser (0,1% Methanol), mit 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. mit 10^{-6} M GA₄ behandelte Keimlinge verwendet. Die Pflanzen wurden in Sprossspitze (Apikalmeristem, Blattansatz), Kotyledonen, Hypokotyl, Wurzelrest und Wurzelspitze (Primärwurzel und Seitenwurzeln, ca. 0,5 - 1 mm) unterteilt geerntet (Abb. 2.2).

Für die Untersuchung der Gibberellin-Biosynthese während der männlichen Blütenentwicklung wurden vier Stadien geerntet (Abb. 2.3). Die Stadien I, II und III bestanden aus verschieden entwickelten Blütenknospen.

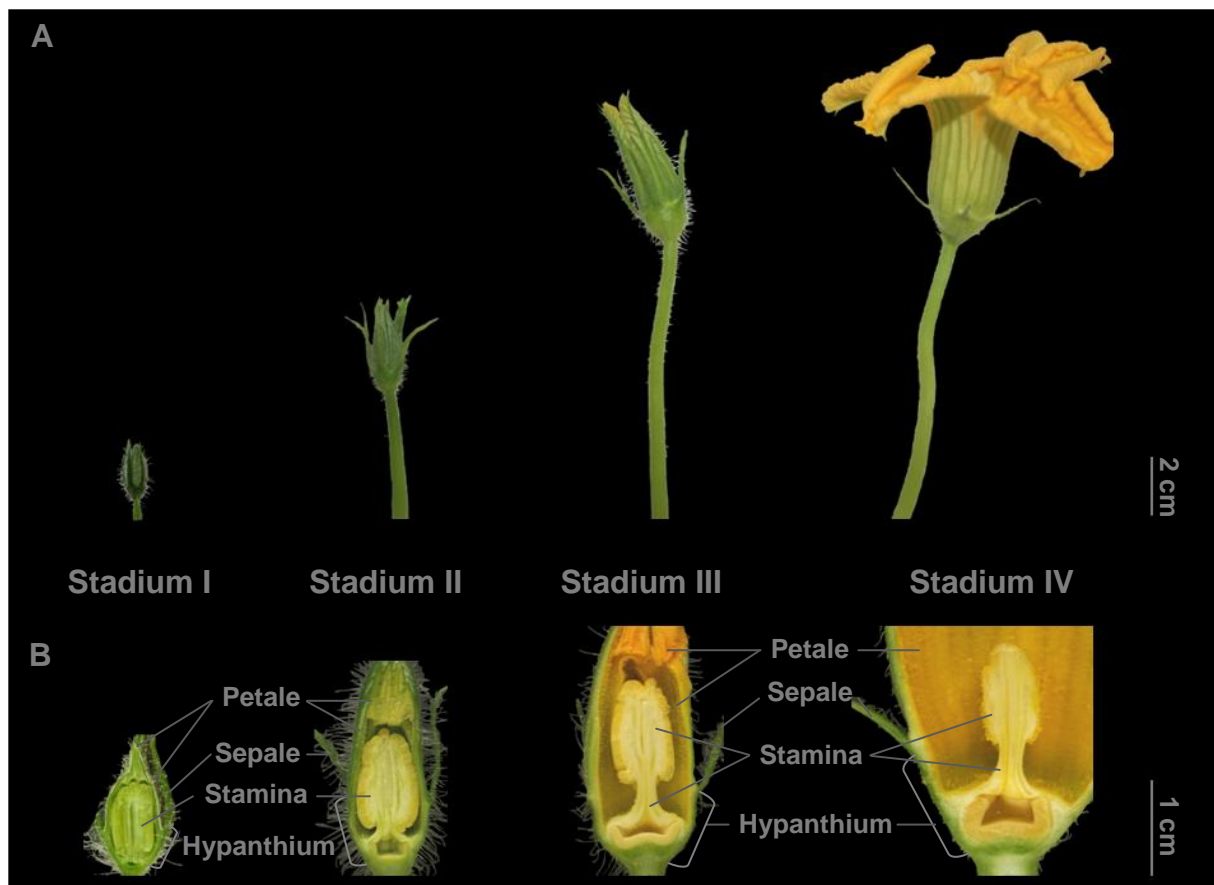


Abb. 2.3: Übersicht über die geernteten Stadien (A) und Organe (B) der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.)

Dabei erfolgte eine Differenzierung der Stadien durch den Entwicklungsgrad der Petalen und der Stamina. Als Stadium I wurden junge Knospen geerntet, in denen die Stamina eine grünliche Färbung aufwiesen, die Filamente ausgebildet aber ungestreckt vorlagen und die in der Blütenknospe enthaltenen Petalen keine sichtbare Abgrenzung zu den Stamina zeigten. In den weiterentwickelten Knospen des Stadiums II war eine Gelbfärbung der Stamina, eine beginnende Streckung der Filamente, eine Abgrenzung der Petalen im Inneren der Blütenknospe von den Stamina und eine beginnende Pigmentierung der Petalen

erkennbar. Als Stadium III wurden die Blütenknospen geerntet, in denen die Entwicklung abgeschlossen war und die kurz vor der Öffnung der Blüte (6 – 18 Stunden) standen. Als letztes Stadium der männlichen Blütenentwicklung, Stadium IV, wurden geöffnete Blüten verwendet.

Die männlichen Blüten wurden dabei bei der Ernte in die verschiedenen Organe unterteilt. Das Hypanthium, die Sepalen und die Petalen wurden in den Blütenknospen der Stadien I, II und III als Ganzes geerntet, wogegen für das Stadium IV eine Trennung der 3 Organe erfolgte. Die Stamina wurden in allen 4 Stadien separat von den anderen Geweben der Blüte geerntet.

2.2 Bakterienanzucht

2.2.1 Bakterienstämme

Es wurden die in der Tabelle 2.1 beschriebenen Bakterienstämme verwendet.

Tab. 2.1: Verwendete *E. coli* und *A. tumefaciens* Bakterienstämme

Bakterienstamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10(Tet^r)</i>]	Stratagene
<i>E. coli</i> GM2163	F ⁻ <i>dam-13::Tn9 (Cam^r) dcm-6 hsdR2 (r_k⁻ m_k⁺) leuB6 hisG4 thi-1 araC14 lacY1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 (Str^r) fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1</i>	Fermentas
<i>E. coli</i> NM522	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_k⁻ m_k⁻)</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^q ΔM15</i>]	Stratagene
<i>E. coli</i> α-Select Electro-poration Competent Cells	<i>deoR endA1 recA1 gyrA96 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argFU169) φ80δlacΔM15 F⁻ λ⁻</i>	Bioline
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	C58, rif ^r	Hellens et al., 2000

2.2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 2.2 dargestellt.

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevanter Genotyp	Größe	Referenz / Acession Nr.
pBluescript II SK⁺	<i>amp^r, lacZ</i>	2,961 kb	Stratagene
pUC18	<i>amp^r, lacZ</i>	2,686 kb	L09136.1
pJet1	<i>bla</i> (Ap ^R), <i>eco47IR</i> , P _{lacUV5}	3,128 kb	Fermentas
pJet1.2	<i>bla</i> (Ap ^R), <i>eco47IR</i> , P _{lacUV5}	2,974 kb	Fermentas
pTRV1	<i>kan^r</i>	/	AF406990 (cDNA des TRV)
pYL156	<i>kan^r</i>	9,663 kb	AF406991

2.2.3 Kultivierungsbedingungen

Nährmedien

Zur Bakterienanzucht wurde Luria Bertani Medium (LB) verwendet, welches für feste Medien mit 1,5% (w/v) Agar versetzt war. Das Medium wurde nach dem Ansetzen mit destilliertem Wasser für 20 min bei 120°C autoklaviert und nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde das für die Selektion benötigte Antibiotikum (Tab. 2.1, Tab. 2.2) hinzugegeben. Die Endkonzentration des Antibiotikums betrug dabei für Gentamicin 20 µg/ml, für Rifampicin 25 µg/ml und für Carbenicillin sowie Kanamycin 50 µg/ml im Medium. Die verwendeten Antibiotikastammlösungen wurden dabei in einer Konzentration von 50 mg/ml mit destilliertem Wasser (Gentamicin, Carbenicillin, Kanamycin) bzw. mit DMSO (Rifampicin) angesetzt, steriltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Kulturen auf LB-Agarplatten

LB-Agarplatten wurden zur Kultivierung von Zellmaterial und zum Erlangen von Einzelkolonien nach erfolgter Transformation bzw. für das Ansetzen von Suspensionskulturen verwendet. Dazu wurde der Transformationsansatz bzw. Zellmaterial einer

Masterplatte oder einer Bakterien-Glycerin-Suspension auf eine mit dem spezifischen Antibiotikum (Tab. 2.1, Tab. 2.2) versetzte LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend invers bei 37°C für *E. coli* bzw. 28°C für *A. tumefaciens* in einem Wärmeschrank inkubiert. Dabei erfolgte die Vervielfältigung der Plasmide pBluescript II SK, pUC18, pJet1 und pJet1.2 über Nacht. Die Kultivierung der Bakterienzellen, welche das low-copy Plasmid pTRV1 bzw. pYL156 enthielten, wurde für 16 – 40 h durchgeführt.

Suspensionskulturen

Für die Vermehrung und Extraktion von Plasmiden, der Herstellung elektrokompenter Bakterien oder der Kultivierung von Bakterien für die Infizierung von Pflanzen wurden Suspensionskulturen verwendet. Dazu wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte in flüssiges LB-Medium mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum (Tab. 2.1, Tab. 2.2) überführt. Die Kultivierung erfolgte je nach Volumen in einem sterilen 50 ml Plastikröhrchen oder in einem sterilen Erlenmeyerkolben bei 37°C für *E. coli* bzw. 28°C für *A. tumefaciens* in einem Schüttelwasserbad bei 200 U/min. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach Art des verwendeten Plasmids. So erfolgte die Kultivierung der high-copy Plasmide (pBluescript II SK, pUC18, pJet1 und pJet1.2) für 16 h und der low-copy Plasmide (pTRV1 und pYL156) für 16 – 40 h.

2.2.4 Erstellung von Stammkulturen

Für die erstellten *E. coli*-Klone (Kap. 2.9, 2.10.1, 2.12.1, 2.14.1) und *A. tumefaciens*-Klone (Kap. 2.14.1) wurden Bakterien-Glycerin-Suspensionen angesetzt, die eine langfristige Konservierung der Bakterien bei -70°C erlaubten. Dazu wurden 770 µl einer Suspensionskultur mit 230 µl 87%igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3 allgemeine molekularbiologische Methoden

2.3.1 Vorbereitung benötigter Geräte und Lösungen

Die verwendeten Geräte und Lösungen wurden vor Gebrauch sterilisiert. Dazu wurden hitzebeständige Geräte und Lösungen für DNA-Arbeiten bei 120°C für 20 min autoklaviert, was auch zur Inaktivierung von DNasen führte. Zur Inaktivierung der RNasen wurden dagegen für RNA-Arbeiten die benötigten Lösungen und Materialien zweimal autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Lösungen wurden durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilisiert und nicht hitzebeständige Geräte sowie die Arbeitsfläche wurden mit 70% Ethanol zur Sterilisation behandelt.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) gegen destilliertes Wasser mit einem Photometer bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1,0 bei dieser Wellenlänge und einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm einer Konzentration von 40 mg/ml einzelsträngiger RNA bzw. von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA. Neben der Konzentration wurde die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen, welche auch Licht der Wellenlänge von 260 nm absorbieren, bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} überprüft, welches bei proteinfreien Nukleinsäurelösungen 1,8 – 2,0 beträgt.

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur größenabhängigen Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen verwendet. Dazu wurde 1 – 1,5% Agarose in 1xTAE-Puffer (w/v) durch Erhitzung gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C in mit Kämme versehende Gelträger gegossen. Bei der Trennung von Fragmenten unter 1kb für die anschließende Extraktion der DNA aus dem Gel wurde dabei 1,5% Agarose und für alle anderen Anwendungen 1%

Agarose verwendet. Das ausgekühlte und feste Gel wurde in eine mit 1xTAE-Puffer befüllte horizontale Flachbrettapparatur eingesetzt und die mit Beschwererlösung (Fermentas) versetzten Proben wurden in die durch den Kamm ausgeformten Taschen geladen. Die RNA-Lösungen wurden dabei vorher zur Lösung von Sekundärstrukturen für 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert.

Nach erfolgter Auftrennung bei 90 V für 60 – 90 min bei DNA-Fragmenten bzw. bei 70 V für 60 – 90 min bei RNA-Fragmenten wurde das Gel für 5 – 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 g/l 1x TAE-Puffer) inkubiert und anschließend für 5 – 10 min in destillierten Wasser gewaschen. Das zwischen den Basen der Nukleinsäure interkalierende Ethidiumbromid fluoreszierte bei Anregung mit UV-Licht, wodurch die aufgetrennten Nukleinsäuren sichtbar wurden. Die Detektion der DNA bzw. RNA erfolgte dabei auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm und mit einer Kamera (GelCam; Phase) wurde ein Bild des Gels mit Hilfe des Computerprogramms WinTV2K® (Version 3.31., Hauppauge, Computer Works) aufgenommen.

Die Größenbestimmung der linearen Nukleinsäurefragmente erfolgte durch Vergleich mit einem Größenstandard (GeneRuler™ 100 bp DNA Plus Ladder, Fermentas bzw. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas bzw. RiboRuler™ RNA Ladder, High Range, Fermentas), welcher zusätzlich zu den Proben auf das Gel aufgetragen und aufgetrennt wurde.

2.3.4 Alkoholpräzipitation

Zur Konzentrierung von RNA-Lösungen wurde eine Präzipitation mit Ethanol durchgeführt. Die RNA-Lösung wurde dazu mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt und anschließend wurde 2,5 Volumen eiskalter 100%iger Ethanol hinzugegeben.

Nach Fällung der RNA für mindestens 16 h bei -70°C wurde 30 min bei 4°C und 20 000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit kaltem 70%igem Ethanol durch 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 20 000 x g gewaschen und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde nach ca. fünfminütiger Lufttrocknung mit DEPC-Wasser, Volumen je nach Pelletgröße, eluiert und die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.3.5 Sequenzierung

Die Sequenz der klonierten Fragmente wurde durch Fluoreszenz-Farbstoff-basierte Sequenzierung ermittelt.

Dazu wurden 400 – 600 ng des Hybridplasmids mit 20 pmol vektorspezifischen Primer gemischt und der Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH zur Sequenzierung übersandt.

2.4 Nukleinsäureaufreinigung

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen erfolgte entsprechend der Kitbeschreibung mit dem Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System-Kit (Promega). Obwohl das Kit zur Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* entwickelt wurde, konnten die TRV-Vektoren aus *A. tumefaciens* isoliert werden. Dafür wurde auf Grund der geringeren Effizienz 12 – 14 ml einer Suspensionskultur benutzt, wogegen zur Isolierung aus *E. coli* 4 ml für high-copy Plasmide (pJet1, pJet1.2, pBluescript II SK, pUC18) bzw. 8 ml für low-copy Plasmide (TRV-Vektoren) verwendet wurden.

Zur Extraktion wurde LB-Medium mit einer Einzelkolonie des Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C für *E. coli* bzw. bei 28°C für *A. tumefaciens* im Schüttelwasserbad bei 200 U/min kultiviert (Kap. 2.2.3). Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 10 000 x g für 5 min in einer Tischzentrifuge geerntet und mit 250 µl der Resuspensionslösung resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 250 µl der zur Zellyse verwendeten Lösung CLA sowie 10 µl der Alkalin-Protease-Lösung versetzt und nach fünfminütiger Inkubation wurde 350 µl Neutralisationslösung hinzugegeben. Der Extraktionsansatz wurde für 10 min bei 11 000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde auf eine Säule geladen. Die Säule wurde zweimal mit der Lösung CWA gewaschen und anschließend wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 40 µl bidestillierten Wasser von der Säule eluiert.

2.4.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Bei den zur Klonierung der Gibberellin-Dioxygenasen durchgeführten Polymerase-Ketten-Reaktionen wurden häufig unterschiedlich große Fragmente in einem Ansatz amplifiziert.

Auch bei der Herstellung der für die Synthese von Standard-RNA benötigten Plasmide lagen durch die Restriktion verschieden große Plasmidfragmente in dem Reaktionsansatz vor. Die PCR-Produkte bzw. der Restriktionsansatz wurden daher mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.3.3), das Gel auf einen UV-Tisch gelegt und die Bande des korrekten Fragments mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die DNA wurde anschließend mit dem GeneJet™ Gel Extraction-Kit (Fermentas) laut Protokoll extrahiert. Dazu wurde das Agarosestück mit 1 V Bindungspuffer (w/v) versetzt und bei 55°C bis zum vollständigen Auflösen der festen Agarose inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Säule geladen, die Säule mit 700 µl Waschpuffer gewaschen und schließlich die DNA von der Säule mit bidestillierten Wasser eluiert. Das Volumen richtete sich dabei nach der gebundenen DNA-Menge.

2.4.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Reaktionen

Die Isolierung von Nukleinsäuren aus Polymerase-Kettenreaktionen, die ausschließlich zur Amplifizierung eines Fragments führten, von Plasmid-DNA aus Linearisierungen und von DNA aus Klenow-Behandlungen wurde mit dem GeneJet™ PCR Purification-Kit (Fermentas) entsprechend der Kitbeschreibung durchgeführt. Dazu wurde dem Reaktionsansatz 1 V Bindungspuffer (w/v) hinzugegeben, der Ansatz auf eine Säule geladen und die Säule mit 700 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit bidestillierten Wasser, Volumen je nach gebundener DNA-Menge, von der Säule eluiert.

2.4.4 Extraktion von Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte entsprechend der Kitbeschreibung mit dem NucleoSpin® RNA Plant-Kit (Machery-Nagel). Dazu wurde das Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben, ca. 100 mg in ein vorgekühltes 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl Puffer RA1 sowie 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Zur groben Trennung der RNA von den Zelltrümmern wurde das Lysat auf einen NucleoSpin® Filter geladen und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70% Ethanol gemischt und auf eine NucleoSpin® RNA Plant-Säule geladen. Die Säule wurde zur Entfernung von Salzen mit 350 µl Puffer MDB gewaschen und schließlich erfolgte ein 15-minütiger DNaseI-Verdau auf der Säule. Danach wurde die DNaseI mit 200 µl Puffer RA2 inaktiviert, die Säule zweimal mit dem Puffer RA3

gewaschen und die RNA mit 45 µl nukleasefreien Wasser von der Säule eluiert. Die extrahierte Gesamt-RNA wurde mittels Photometer quantifiziert (Kap. 2.3.2), zusätzlich mit DNaseI verdaut (Kap. 2.5.4), alkoholpräzipitiert (Kap. 2.3.4) und bei -70°C gelagert.

2.5 Enzymatische Modifizierung

2.5.1 Verdau mit Restriktionsenzymen

Zur Erzeugung der bei einer Ligation benötigten komplementären Enden, zur Linearisierung von Plasmiden sowie zur Erstellung von Restriktionskarten wurden Endonukleasen des Typs II verwendet. Diese schneiden doppelsträngige DNA an einer spezifischen Erkennungssequenz, wobei ihre Aktivität durch hohe Konzentrationen von Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA und bestimmten, je nach Enzym unterschiedlichen, Salzen beeinträchtigt wird. Daher wurde DNA aus PCR-Ansätzen vor dem Verdau zunächst aufgereinigt, wogegen die extrahierte Plasmid-DNA für einen direkten Verdau verwendet werden konnte.

Für den Verdau wurden die Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer der Firma Fermentas benutzt. Dazu wurden die zu verdauende DNA-Lösung, der für das Enzym spezifische Restriktionspuffer und die Endonuklease bzw. bei einem Doppelverdau die Endonukleasen gemischt und gegebenenfalls mit sterilem, destilliertem Wasser auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. Die in Tabelle 2.3 dargestellten verwendeten Standardinkubationsansätze wurden dabei in einem 250 µl Reaktionsgefäß zusammenpipettiert.

Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten Standardinkubationsansätze zur Erzeugung von komplementären Enden, zur Linearisierung oder Überprüfung von klonierten Fragmenten

	Komplementäre Enden		Linearisierung	Restriktionskarte
	PCR-Produkt	Plasmid	Plasmid	Plasmid
DNA-Lösung	14 µl	8 – 10 µg	8 – 10 µg	1 µg
10 x Restriktionspuffer	2 – 4 µl	10 – 20 µl	10 µl	1 – 2 µl
Restriktionsenzym 1	5 U	20 U	20 U	2 U
Restriktionsenzym 2	5 – 10 U	20 – 40 U	/	2 – 4 U
Steriles H₂O_{bidest}	ad 20 µl	ad 100 µl	ad 100 µl	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgte bei der für das verwendete Restriktionsenzym optimalen Temperatur (meist 37°C) in einem Thermocycler für 3 h bei 10 µl Ansätzen bzw. über Nacht bei größeren Ansätzen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der 6 x Beschwererlösung für die anschließende Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.3.3) oder durch Aufreinigung der DNA (Kap. 2.4.3) abgestoppt.

2.5.2 Auffüllen von 5'-Überhängen und Entfernung von 3'-Überhängen

Zur Herstellung von Standard-RNA für die kompetitive RT-PCR wurden die Hybridplasmide mittels Restriktion oder PCR basierter Methode verkürzt. Dabei waren die erzeugten Enden meist nicht komplementär, so dass vor einer Religation bzw. einer Ligation des PCR-Fragments in den geöffneten Vektor eine Behandlung mit dem Klenow-Fragment vorgenommen werden musste. Dadurch wurden durch die 5'→3'-Polymeraseaktivität und die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms 5'-Überhänge aufgefüllt und 3'-Überhänge abgespalten. Dazu wurde der folgende Standardinkubationsansatz in einem 250 µl Reaktionsgefäß zusammenpipettiert.

DNA (0,1 – 4 µg)	max. 15 µl
10x Klenow-Reaktionspuffer	2 µl
dNTPs (jeweils 2mM)	0,5 µl
Klenow-Fragment (10 U/µl)	0,5 µl
steriles H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Die Inkubation fand bei 37°C für 10 min im Thermocycler statt und anschließend wurde für 10 min bei 75°C das Enzym deaktiviert. Die DNA wurde aufgereinigt (Kap. 2.4.3) und für eine Ligation mit glatten Enden eingesetzt (Kap. 2.5.3).

2.5.3 Ligation

Zur ungerichteten Ligation von PCR-Fragmenten wurde der für die Klonierung von PCR-Produkten entwickelte Vektor pJet1 bzw. pJet1.2 verwendet. Dies erfolgte mit dem GeneJET™ PCR Cloning- bzw. dem CloneJET™ PCR Cloning-Kit (Fermentas) gemäß der Kitbeschreibung. Da die durch Aktivität der *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte

3'dA-Überhänge besaßen, wurden diese in einem ersten Schritt vor der Ligation abgespalten. Dazu wurde folgender Standardansatz auf Eis pipettiert.

2x Reaktionspuffer	5 µl
PCR-Produkt	molares Verhältnis 5:1
DNA Blunting Enzym	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 9 µl

Der Ansatz wurde für 5 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden folgende Bestandteile hinzugegeben.

pJet1/blunt bzw. pJet1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	0,5 µl

Es wurde für 30 min bei 22°C inkubiert und anschließend wurden 5 µl des ligierten Konstrukts direkt zur chemischen Transformation von *E. coli* (Kap. 2.6.3) eingesetzt.

Bei der Verwendung der *Pfu*-Polymerase konnten die PCR-Produkte direkt für die Ligation eingesetzt werden. So wurde das PCR-Produkt mit dem Reaktionspuffer, dem Vektor und der T4 DNA Ligase gemischt, für 30 min bei 22°C inkubiert und anschließend zur chemischen Transformation verwendet.

Die Vektoren pBluescript II SK und pUC18 wurden zur Klonierung des offenen Leserahmens der Gibberellin-Dioxygenasen sowie zur Herstellung des zur Synthese von Standard-RNA verwendeten Hybridplasmids benutzt. Dazu wurde das zu ligierende Fragment mit den geöffneten Vektor, der zu dem Fragment komplementäre Enden besaß, in einem molaren Verhältnis von 5:1 gemischt. Dabei wurden die im folgendem dargestellten Standardinkubationsansätze in einem 250 µl Reaktionsgefäß zusammenpipettiert.

	Enden mit 5'Überhang	glatte Enden
Linearisierter Vektor	100 ng	100 ng
Fragment	x µl	x µl
10 x Ligations-Puffer	1 µl	1 µl
PEG 4000 (TEXT)	/	1 µl
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
Steriles H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgte bei 16°C für 6 – 16 h im Thermocycler. Anschließend wurden 5 µl des ligierten pBluescript II SK-Konstrukts chemisch in kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms

XL1-Blue bzw. 5 µl des ligierten pUC18-Konstrukts chemisch in kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms NM522 transformiert (Kap. 2.6.3).

Die Ligation der Fragmente in den für die Infizierung von Pflanzen verwendeten viralen Vektor pYL156 erfolgte entsprechend dem Protokoll für Enden mit 5'-Überhang. Dabei wurde der Ansatz für 2 – 3 Tage bei 4°C inkubiert.

2.5.4 DNaseI-Verdau mit anschließender Erhitzung

Bei der durchgeführten DNaseI-Behandlung während der Extraktion der Gesamt-RNA (Kap. 2.4.4) wurde die genomische DNA nicht vollständig verdaut, so dass ein zusätzlicher Verdau vorgenommen wurde. Dazu wurde in einem 150 µl Ansatz maximal 15 µl RNA-Lösung bzw. bei hochkonzentrierten Lösungen maximal 15 µg RNA mit 15 µl 10 x DNaseI-Puffer vermischt. Für je 1 µg zu verdauender RNA wurde 1 U DNaseI (Fermentas) hinzugefügt. Es wurde mit DEPC-Wasser auf das Gesamtvolumen aufgefüllt und bei 37°C für 30 min im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 15 µl 50 mM EDTA versetzt und die DNaseI wurde bei 65°C für 10 min im Thermocycler inaktiviert. Die verdaute RNA wurde mittels Ethanol präzipitiert (Kap. 2.3.4) und anschließend bei -70°C gelagert.

2.5.5 DNaseI-Verdau mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion

Die linearisierte Plasmid-DNA wurde nach erfolgter *in vitro* Transkription (Kap. 2.10.1) verdaut. Dazu wurden 2 U DNaseI (Fermentas) direkt in den Ansatz gegeben, der anschließend bei 37°C im Thermocycler für 15 min inkubiert wurde. Die Lösung wurde danach mit sterilem bidestilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (5 V: 1 V, pH 4,7) versetzt, gemischt und für 3 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1 V Chloroform versetzt und gemischt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 11 000 x g wurde die obere, RNA-haltige Phase in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend einer Alkoholpräzipitation unterzogen (Kap. 2.3.4).

2.6 Transfer von DNA

2.6.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die erstellten TRV-Vektoren wurden für die Infizierung der Pflanzen mittels Agrobakterium-vermittelten Gentransfers in den *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 elektroporiert. Zur Erstellung der dazu benötigten elektrokompetenten Zellen wurde Zellmaterial des Stamms GV3101 auf eine LB-Agarplatte (25 µg/ml Rifampicin) ausgestrichen und über Nacht invers bei 28°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in 100 ml LB-Medium (25 µg/ml Rifampicin) überführt und bei 28°C und 200 U/min für ungefähr 26 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 inkubiert. Die optische Dichte der Kultur wurde dazu mit einem Photometer bei 600 nm gegen LB-Medium (25 µg/ml Rifampicin) bestimmt. Die Zellen wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4000 x g und 4°C geerntet, mit 50 ml kaltem, sterilen, destillierten Wasser resuspendiert und erneut für 10 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach dreimaliger Wiederholung des Waschschriffs mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit 1,5 ml kaltem, sterilem 10%igem Glycerin resuspendiert und anschließend für 10 min bei 4000 x g und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 250 µl sterilen, kalten 10%igen Glycerin aufgenommen und es wurden Aliquots von 80 µl erstellt, welche in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zu 6 Monate gelagert wurden.

2.6.2 Elektroporation

Die TRV-Vektoren wurden in elektrokompetente *E. coli* (α-Select Electroporation Competent Cells, Bioline) bzw. in elektrokompetente *A. tumefaciens* des Stamms GV3101 elektroporiert. Für die Transformation des ligierten TRV-Konstrukts in elektrokompetente *E. coli* wurde 1 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl Bakterienzellen vermischt. Nach einminütiger Inkubation auf Eis wurde das Gemisch in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette (BioRad) überführt und elektroporiert. Dafür wurde eine Pulsdauer von 5 msec, eine Spannung von 2,5 kV, eine Kapazität von 25 µF und ein Widerstand von 200 Ω verwendet. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium (Zusammensetzung s. Seite 34) für 1 h bei 37°C und 200 U/min in einem Schüttelwasserbad inkubiert. 100 µl bzw. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und invers bei 37°C für 20 – 30 h inkubiert.

Die Elektroporation des extrahierten Plasmids in *A. tumefaciens* erfolgte mit einigen Abweichungen entsprechend. So wurden 1 µl Plasmid-DNA mit 80 µl elektrokompente Zellen vermischt und an Stelle einer einstündigen Inkubation in SOC-Medium erfolgte eine dreistündige Inkubation in 1 ml LB-Medium bei 28°C. Auf LB-Agarplatten (50 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Rifampicin) wurden 200 µl des Ansatzes ausplattiert und die Platten wurden invers für 20 – 24 h bei 28°C inkubiert.

SOC-Medium

Trypton	2% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	8,6 mM
KCl	2,5 mM
MgSO ₄	20 mM
Glucose	20 mM

2.6.3 chemische Transformation

Die ligierten pJet1-, pJet1.2-, pBluescript II SK- bzw. pUC18-Konstrukte wurden in chemisch kompetente *E. coli* (XL1-Blue, GM2163 oder NM522) transformiert. Die Erstellung der kompetenten Zellen sowie die Transformation erfolgten gemäß der Kitbeschreibung mit dem TransformAid™ Bacterial Transformation-Kit (Fermentas). Dazu wurden die Zellen in C-Medium über Nacht bei 37°C und 200 U/min im Schüttelwasserbad kultiviert. Von dieser Vorkultur wurde mit C-Medium eine 1:10-Verdünnung erstellt und die Suspension für 20 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden 750 µl der Suspension pelletiert, mit 150 µl T-Lösung resuspendiert und nach 5 minütiger Inkubation auf Eis erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 50 µl T-Lösung resuspendiert und anschließend auf Eis für 5 min inkubiert. 5 µl der ligierten Konstrukte wurden mit 50 µl chemisch kompetente Zellen gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf vorgewärmte LB-Agarplatten (50 µg/ml Carbenicillin) ausplattiert und über Nacht invers bei 37°C im Wärmeschränk kultiviert.

2.7 Reverse Transkription (RT)

Zum Umschreiben der aus dem Pflanzenmaterial extrahierten Transkripte in einzelsträngige cDNA wurde die Reverse Transkription (RT) verwendet. Dazu wurde für die Synthese von cDNA zur Klonierung der Gibberellin-Dioxygenasen bzw. des PDS-Fragments Oligo(dT)₁₈-Primer, die spezifisch an den Poly-A-Schwanz von mRNA binden, oder Random Hexamer Primer eingesetzt. Bei der Quantifizierung der Transkriptgehalte wurde dagegen ein für das zu untersuchende Transkript spezifischer Primer hergestellt und verwendet. Die genspezifischen Primer sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgelistet.

In einem ersten Schritt wurde der entsprechende Primer mit der Gesamt-RNA und bei einer kompetitiven RT-PCR zusätzlich mit der Standard-RNA in einem 250 µl Reaktionsgefäß auf Eis gemischt.

	RT-PCR	kompetitive RT-PCR
Gesamt-RNA	200 – 500 ng	50 – 100 ng
Standard-RNA	/	0 – 10 pg
Primer	0,5 µl	0,5 µl
Oligo(dT) ₁₈ -Primer (100 µM)		
Random Hexamer Primer (100 µM)		
Genspezifischer Primer (10µM)		
DEPC-Wasser	ad 3 µl	ad 3 µl

Zur Lösung von Sekundärstrukturen wurde der Reaktionsansatz für 5 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis, wodurch der Primer an den komplementären RNA-Bereich binden konnte, wurden folgende Bestandteile hinzugefügt.

5 x Reaktionspuffer	1 µl
dNTPs (jeweils 10mM)	0,5 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,25 µl
RevertAid [®] H Minus-MuL V RT (200 U/µl)	0,25 µl

Der Reaktionsansatz wurde zur cDNA-Synthese durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität des verwendeten Enzyms für 1 h bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C deaktiviert. Die gebildete cDNA wurde entweder direkt als Template für die Polymerase-Ketten-Reaktion (Kap. 2.8) benutzt oder bei -20°C gelagert.

2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet, die sich aus drei unterschiedlichen, sich wiederholenden Einzelreaktionen zusammensetzte. Die DNA-Doppelstränge wurden dabei durch Erhitzung auf 94°C im Denaturierungsschritt getrennt, im nachfolgenden Annealingsschritt erfolgte die Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge und in dem anschließenden Elongationsschritt wurden durch die 5'→3'-Polymeraseaktivität des verwendeten Enzyms der komplementäre DNA-Strang synthetisiert.

Zur Amplifizierung der Fragmente wurden entweder genspezifische Primer (Kap. 2.8.1) oder degenerierte Primer (Kap. 2.8.2) verwendet. Dazu wurden die PCR-Ansätze in einem Thermocycler den unterschiedlichen Temperaturen unterzogen.

Zunächst erfolgte eine initiale Denaturierung bei 94°C für 5 min. Dem folgten 35 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingsschritt und einem Elongationsschritt bestand. Die Denaturierung erfolgte dabei für 30 sec bei 94°C. Die Annealingtemperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Primer und der Ansatz wurde somit der für die verwendeten PCR-Primer ermittelten Temperatur für 30 sec unterzogen. Dabei wurde in der Regel die Annealingtemperatur 2 – 5°C niedriger gewählt als der Mittelwert der beiden Schmelztemperaturen. Die Elongation erfolgte bei 72°C, wobei die Dauer des Schritts der Länge des zu amplifizierenden Fragments und des verwendeten Enzyms angepasst wurde. So benötigt die *Taq*-DNA-Polymerase (Fermentas) zur Synthese von 1 kb ca. 1 min und die *Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas) 2 min. Abschließend wurde eine finale Elongation für 5 min bei 72°C durchgeführt.

2.8.1 PCR mit genspezifischen Primern

Für die Amplifizierung von Fragmenten mit genspezifischen Primern wurde folgender 10 µl Reaktionsansatz in einem 250 µl Reaktionsgefäß zusammenpipettiert.

	<i>Taq</i>-Polymerase	<i>Pfu</i>-Polymerase
Template	max. 1 µl	max. 1 µl
10x PCR-Puffer (500 mM KCl)	1 µl	/
10x PCR-Puffer (20 mM MgSO ₄)	/	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,6 µl	/
DMSO	0,2 µl	0,2 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,2 µl	0,2 µl
Forward-Primer (10 µM)	0,2 µl	0,2 µl
Reverse-Primer (10 µM)	0,2 µl	0,2 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,06 µl	/
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	/	0,2 µl
Steriles H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl	ad 10 µl

Dabei wurde für die Klonierung neuer Gibberellin-Dioxygenasen die *Pfu*-Polymerase und für alle anderen Anwendungen die *Taq*-Polymerase verwendet. Dabei besaß die *Pfu*-Polymerase eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, wodurch weniger Fehler bei der DNA-Synthese auftraten. Dagegen war die *Taq*-Polymerase effizienter, so dass deutlich mehr Kopien bei gleicher Zyklenzahl synthetisiert wurden.

Als Template wurde entweder 1 µl cDNA, 1 ng Plasmid-DNA oder eine Einzelkolonie nach erfolgter Transformation verwendet. Die Kolonie wurde dabei mit einem sterilen Zahnstocher direkt in den 10 µl Reaktionsansatz überführt und anschließend wurde zur Konservierung des Klon mit dem Zahnstocher eine neue LB-Agarplatte ausgestrichen.

Bei der Reamplifizierung von DNA-Produkten wurden 50 µl oder 100 µl Reaktionsansätze verwendet, die entsprechend dem dargestellten 10 µl Ansatz durchgeführt wurden.

Die verwendeten Primer sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgelistet.

2.8.2 PCR mit degenerierten Primer

Bei Verwendung von degenerierten Primern wurde der folgende Standardinkubationsansatz in einem 250 µl Reaktionsgefäß gemischt.

	Taq-Polymerase
cDNA	1 µl
10x PCR-Puffer (KCl)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,6 µl
DMSO	0,2 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,2 µl
Forward-Primer (50 µM)	0,4 µl
Reverse-Primer (50 µM)	0,4 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,06 µl
Steriles H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl

Die Reamplifizierung des PCR-Produkts erfolgte dabei in einem 50 µl Reaktionsansatz, der entsprechend durchgeführt wurde.

Die verwendeten Primer sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgelistet.

2.9 Klonierung der Gibberellin-Dioxygenasen

Aus Wurzelspitzen 7 Tage alter *Cucurbita maxima* wurden neue für Gibberellin-Dioxygenasen kodierende Gene identifiziert und kloniert. Dazu wurden durch einen Vergleich der Aminosäuresequenz bekannter Gibberellin 20-Oxidasen (*Cucurbita maxima*: X73314, U61385, AJ308480; *Cucumis sativus*: Csa021105, Csa012495, Csa014142) bzw. Gibberellin 3-Oxidasen (*Cucurbita maxima*: U63650, AJ006453, AJ302040; *Cucumis sativus*: ACHR01000613.1, ACHR01000614.1, Csa005826, Csa005827) hochkonservierte Bereiche identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls in den unbekannten Dioxygenasen vorkommen. Für die Suche neuer Gibberellin-Dioxygenasen wurden daher Primer erstellt, die innerhalb dieser Bereiche binden und eine Amplifizierung eines 250 – 450 bp großen Fragments erlaubten. Dazu wurde als Grundlage die Aminosäuresequenz aller verglichenen Gibberellin 3-Oxidasen bzw. Gibberellin 20-Oxidasen verwendet. Dabei wurden die Primer teilweise mit einer hohen Homologie zu bekannten Gibberellin 2-Oxidasen erstellt, so dass neben der Amplifizierung von Gibberellin 20-Oxidasen auch die Möglichkeit der Amplifizierung von Gibberellin 2-Oxidasen bestand.

Die degenerierten Primer wurden in einer PCR mit cDNA aus 7 Tage alten Wurzelspitzen als Template eingesetzt, das amplifizierte Fragment in pJet1.2 kloniert und sequenziert (Kap. 2.9.1). Die Sequenz der Fragmente der neu identifizierten Gibberellin 20-Oxidase, Gibberellin 3-Oxidase und Gibberellin 2-Oxidase diente zur Erstellung der für die RLM-RACE

benötigten genspezifischen Primer. Damit konnten die unbekannten 5`- und 3`-Bereiche der Transkripte amplifiziert werden, worauf sie in pJet1.2 kloniert und sequenziert wurden (Kap. 2.9.2). An Hand der Sequenz des 5`- und 3`-Bereichs konnte das Start- und das Stoppcodon identifiziert werden, wodurch Primer für die Amplifizierung und spätere orientierte Klonierung des offenen Leserahmens in pBluescript II SK hergestellt werden konnten (Kap. 2.9.3).

2.9.1 PCR basiertes „Screening“

Für die Identifizierung neuer Gibberellin-Dioxygenasen wurde eine PCR mit den degenerierten Primern (Kap. 6.1) unter Verwendung von cDNA aus Wurzelspitzen 7 Tage alter Keimlinge durchgeführt. Dazu wurde in einem ersten Schritt mit Oligo(dT)₁₈-Primern aus Gesamt-RNA 7 Tage alter Keimlinge cDNA synthetisiert (Kap. 2.7). Diese wurde als Template zur Amplifizierung der Fragmente in einem in Kapitel 2.8.2 dargestellten 10 µl PCR-Ansatz unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Dabei wurde der Annealingschritt für 30 sec bei 50°C bei Verwendung der Primer zur Amplifizierung neuer Gibberellin 20-Oxidasen und Gibberellin 2-Oxidasen bzw. 55 °C zur Amplifizierung neuer Gibberellin 3-Oxidasen durchgeführt. Die Elongationszeit betrug jeweils 30 sec. Neben den Ansatz zur Amplifizierung des Fragments wurde je ein Ansatz, der ausschließlich den Forward- bzw. den Reverse-Primer enthielt durchgeführt, um eventuelle unspezifische Primerbindungen sichtbar zu machen.

In einem 50 µl PCR-Ansatz wurde unter Verwendung von 5 µl einer 1:50-Verdünnung des PCR-Produkts das Fragment reamplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgetrennt (Kap. 2.3.3), die DNA des korrekten Fragments aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.4.2), in pJet1.2 ligiert (Kap. 2.5.3) und in GM2163 chemisch transformiert (Kap. 2.6.3). Die Klone wurden mittels PCR überprüft (Kap. 2.8.1). Dazu wurde ein 10 µl PCR-Ansatz mit den vektorspezifischen Primern und der Einzelkolonie als Template bei einer Annealingtemperatur von 60°C durchgeführt. Positive Klone wurden über Nacht in LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) kultiviert (Kap. 2.2.3), die Plasmid-DNA wurde extrahiert (Kap. 2.4.1) und sequenziert (Kap. 2.3.5).

2.9.2 RNA Ligase Mediated-RACE (RLM-RACE)

Zur Identifizierung der unbekannten 5`- und 3`-Bereiche der neuen Gibberellin 20-Oxidase, Gibberellin 3-Oxidase und Gibberellin 2-Oxidase wurde die RNA Ligase Mediated-RACE (RLM-RACE) verwendet.

Zur Amplifizierung des 5`-Bereichs der Transkripte wurde das Kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion) verwendet. Dabei wurde die Durchführung zur Erhöhung der bei der RACE erzeugten Produktmenge modifiziert.

Zuerst wurde die verwendete Wurzelspitzen-RNA 7 Tage alter *Cucurbita maxima* desphosphoryliert. Dazu wurde die Alkalin-Phosphatase der Firma Fermentas in dem folgenden Reaktionsansatz verwendet.

Gesamt-RNA	2,5 µg
10 x CIAP-Puffer	5 µl
CIAP (1 U/µl)	2,5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde für 30 min im Thermocycler bei 37°C inkubiert und anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (5 V:1 V, pH 4,7) gemischt und für 3 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1 V Chloroform versetzt und gemischt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 11 000 x g wurde die obere, RNA-haltige Phase in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend einer Alkoholpräzipitation unterzogen (Kap. 2.3.4).

Das Pellet wurde mit 5 µl DEPC-Wasser eluiert und zur Abspaltung der Cap-Struktur durch die Tobacco Acid Phosphatase verwendet. Dazu wurden folgende Bestandteile in einem 250 µl Reaktionsgefäß gemischt.

CIAP´d-RNA	5 µl
10 x TAP-Puffer	1 µl
TAP	2 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Es wurde für 1 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert und die RNA anschließend direkt für die Ligation des 5`-RACE-Adapters in dem folgenden Standardansatz verwendet.

CIAP'd/TAP'd-RNA	2 µl
5'-RACE-Adapter (0,3 µg/µl)	0,5 µl
10 x Ligase-Puffer	0,5 µl
T4 RNA-Ligase (2,5U/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	ad 5 µl

Der Ansatz wurde für 1h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. 1 µl der RNA wurde als Template in die Reverse Transkription eingesetzt. Dabei wurde die RT wie im Kapitel 2.7 beschrieben unter Verwendung von Oligo(dT)₁₈-Primer bzw. Random Hexamer Primer durchgeführt. In der darauffolgenden Nested-PCR wurde anschließend der 5'-Bereich amplifiziert. Dazu wurde in einer ersten PCR 1 µl der cDNA unter Verwendung eines genspezifischen und eines adapterspezifischen Primers und der *Pfu*-Polymerase (Kap. 2.8.1) eingesetzt. Zur Erhöhung der Spezifität des amplifizierten 5'-Bereichs wurde 1 µl einer 1:10-Verdünnung des PCR-Produkts in eine weitere PCR eingesetzt. Dazu wurden ein genspezifischer und ein adapterspezifischer Primer verwendet, die innerhalb des amplifizierten Fragments banden (Abb. 2.4).

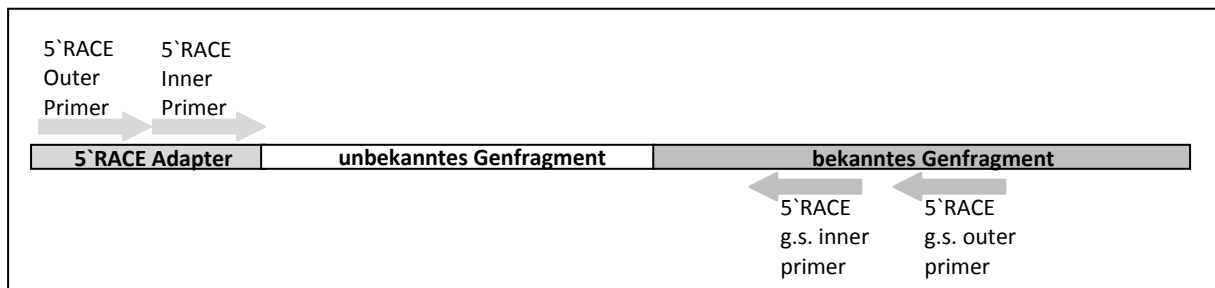


Abb.2.4: Übersicht über die Bindungsstellen der Primer der 5'-RLM-RACE

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden dabei sowohl bei einer Annealingtemperatur von 55°C als auch von 58°C durchgeführt. Die bei der Nested-PCR verwendeten genspezifischen Primer sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgelistet.

Die 3'-RLM-RACE wurde mit dem Kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion) durchgeführt. Dazu wurde zuerst der 3'-RACE-Adapter an die verwendete Gesamt-RNA aus 7 Tage alten Wurzelspitzen wie folgt ligiert. Dabei wurde die Reverse Transkriptase, der RT-Puffer und der RNase-Inhibitor der Firma Fermentas verwendet.

Gesamt-RNA	500 ng
dNTPs (jeweils 2,5 mM)	2 µl
3`-RACE-Adapter	1 µl
5 x RT-Puffer	2 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl
RevertAid®H Minus-MuL V RT (200 U/µl)	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 42°C im Thermocycler inkubiert und anschließend wurde das Enzym durch zehnmünütige Erhitzung auf 70°C inaktiviert. Die gebildete cDNA wurde direkt in die darauffolgende Nested-PCR eingesetzt (Abb. 2.5), die wie für die 5`-RACE beschrieben durchgeführt wurde. Die dafür verwendeten genspezifischen Primer sind im Anhang (Kap. 6.1) dargestellt.

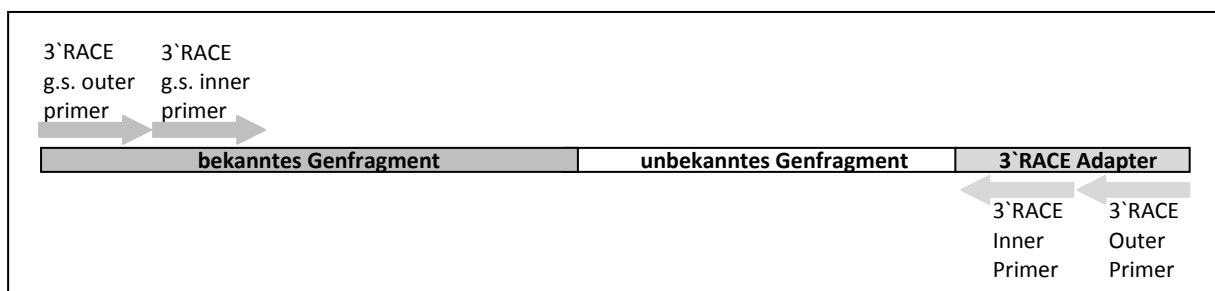


Abb.2.5: Übersicht über die Bindungsstellen der Primer der 3`-RLM-RACE

Die bei der 5`-Race bzw. 3`-RACE amplifizierten Fragmente der zweiten PCR wurden in einem 50 µl PCR-Ansatz reamplifiziert. Anschließend wurde das Fragment über Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.3.3), die DNA wurde aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.4.2), in pJet1.2 ligiert (Kap. 2.5.3) und in kompetente *E. coli* transformiert (Kap. 2.6.3). Zur Überprüfung der Klone wurde eine PCR mit den vektorspezifischen Primern bei 60°C durchgeführt (Kap. 2.8.1) und positive Klone in einer Suspensionskultur (50 µg/ml Carbenicillin) über Nacht inkubiert (Kap. 2.2.3). Die Plasmid-DNA wurde extrahiert (Kap. 2.4.1) und sequenziert (Kap. 2.3.5).

2.9.3 Klonierung des kodierenden Bereichs

Für die Amplifizierung des offenen Leserahmens wurden genspezifische Primer erstellt, die für ein orientiertes Klonieren in pBluescript II SK Restriktionsschnittstellen enthielten (Kap.

6.1). Es wurde 1 µl cDNA, die unter Verwendung von Random Hexamer Primer aus Wurzelspitzen-RNA 7 Tage alter Kürbiskeimlinge synthetisiert wurde (Kap. 2.7), in einem 10 µl PCR-Ansatz mit der *Pfu*-Polymerase eingesetzt (Kap. 2.8.1). Dabei wurde der Annealingschritt für 30 sec bei 50°C für *CmGA20ox4* sowie *CmGA3ox4*, 52°C für *CmGA2ox2* bzw. 55°C für *CmGA2ox3* durchgeführt und die Elongation erfolgte bei 72°C für 90 sec. 10 µl einer 1:50-Verdünnung des PCR-Produkts wurden in dem nachfolgenden 100 µl PCR-Ansatz eingesetzt, das PCR-Produkt auf einem Gel aufgetrennt (Kap. 2.3.3) und die DNA des Fragments mit der korrekten Größe aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.4.2). Die Fragmente und der Vektor pBluescript II SK wurden mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten (Kap. 2.5.1), um komplementäre Enden zu erzeugen. Anschließend wurde der offene Leserahmen in pBluescript II SK ligiert (Kap. 2.5.3) und das Hybridplasmid in *E. coli* des Stamms XL1-Blue chemisch transformiert (Kap. 2.6.3). Die Klone wurden in einer PCR mit den vektorspezifischen M13-Primern bei einer Annealingtemperatur von 60°C überprüft (Kap. 2.8.1). Die positiven Klone wurden in LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) über Nacht kultiviert (Kap. 2.2.3), die Plasmid-DNA extrahiert (Kap. 2.4.1) und sequenziert (Kap. 2.3.5).

Die vollständige Klonierung, von der cDNA-Synthese über die Amplifizierung und Ligation bis zur Transformation wurde zwei Mal separat durchgeführt, um mögliche vor allem durch die Polymerase bei der PCR verursachte Sequenzfehler aufzudecken.

2.9.4 Sequenzanalyse

Zur Analyse von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wurden folgende Programme verwendet.

Blast	NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
Alignment	ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)
Restriktionsmappen	Webcutter 2.0 (http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/)
Phylogenetischer Baum	Geneious Pro 5.4

2.10 kompetitive Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die kompetitive Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Transkripten der Gibberellin-Dioxygenase-Gene, der Gibberellin-Rezeptor-Gene und der Gibberellin-Signaltransduktions-Gene verwendet. Dabei wurde in einem ersten Schritt durch Aktivität der Reversen Transkriptase zu der in der Probe enthaltenen RNA cDNA synthetisiert (Kap. 2.7), die in einer anschließenden PCR exponentiell amplifiziert wurde (Kap. 2.8.1). Sowohl für die Synthese der cDNA als auch für die Bildung und Vervielfältigung der doppelsträngigen DNA wurden genspezifische Primer eingesetzt, wodurch mit einer hohen Sensitivität selbst geringe RNA-Mengen nachgewiesen werden konnten. Die verwendeten Temperaturprogramme und genspezifischen Primer sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgelistet.

Zur Quantifizierung des Transkriptgehalts wurde zusätzlich eine interne Standard-RNA in einer bekannten Menge dem RT-PCR-Ansatz hinzugegeben und koamplifiziert. Dafür wurde das in einem Vektor klonierte Fragment des zu untersuchenden Gens in der Größe modifiziert und zur Herstellung von Standard-RNA verwendet (Kap. 2.10.1). Dadurch herrschten für das Transkript und den Standard annähernd die gleichen Bedingungen bei der Reversen Transkription sowie der kompetitiven Amplifikation, konnten aber im Agarosegel für die Auswertung (Kap. 2.10.3) unterschieden werden.

Vor der Quantifizierung von Transkriptgehalten wurde jede aus den Keimlings- und Blütenorganen extrahierte Gesamt-RNA auf genomische DNA überprüft. Dazu wurde mit den bei der RT-PCR verwendeten genspezifischen PCR-Primern und dem spezifischen PCR-Programm jeweils eine PCR mit 100 ng Gesamt-RNA durchgeführt. Im Fall einer Amplifikation für eine oder mehrere der Gibberellin-Dioxygenasen, der Gibberellin-Rezeptoren bzw. der DELLAs wurde die Gesamt-RNA erneut mit DNaseI (Kap. 2.5.4) verdaut und mittels PCR überprüft. Entsprechend wurde der vollständige Verdau des linearisierten Plasmids nach erfolgter Herstellung der Standard-RNA (Kap. 2.10.1) kontrolliert.

2.10.1 Herstellung der internen Standard-RNA

Für die *CmGA7ox*, *CmGA20ox3*, *CmGA3ox1*, *CmGA3ox2*, *CmGA2ox1*, *CmGID1b*, *CmGAIPa* und *CmGAIPb* waren Hybridplasmide vorhanden (Tab. 2.4), deren klonierte Genfragmente in der Größe von dem zu untersuchenden Transkript abwichen und somit zur Herstellung der Standard-RNA verwendet werden konnten.

Der in pBluescript II SK klonierte offene Leserahmen der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* (Kap. 2.9.3) sowie das Genfragment der *CmGA3ox3* (Lange et al., 2005) und *CmGID1a* (Kufka, 2007) wurden in der Größe modifiziert. Dazu wurde das Fragment der *CmGA20ox4* mit dem Restriktionsenzym *NcoI* verdaut (Kap. 2.5.1), welches an der Position 290 bp und 444 bp das Fragment schnitt. Das verdaute Plasmid wurde über Gelelektrophorese von dem herausgeschnittenen 154 bp großen Fragment getrennt (Kap. 2.3.3), die DNA aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.4.2), das Plasmid religiert (Kap. 2.5.3; Abb. 2.6) und in XL1-Blue transformiert (Kap. 2.6.3).

Dementsprechend wurde der Standard für die *CmGA3ox4* verkürzt. Dafür wurde das Plasmid einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *BpiI* und *PstI* unterzogen (Kap. 2.5.1), die an der Position 467 bp bzw. 625 bp das Fragment schnitten. Nach Auftrennung (Kap. 2.3.3) und Extraktion der Plasmid-DNA (Kap. 2.4.2) wurde der durch das Enzym *PstI* erzeugte 3'-Überhang entfernt (Kap. 2.5.2), um für die Religation (Kap. 2.5.3) benötigte komplementäre Enden zu erzeugen. Das religierte Plasmid (Abb. 2.6) wurde anschließend in XL1-Blue transformiert (Kap. 2.6.3).

Die klonierten Fragmente der *CmGA3ox3*, *CmGA2ox2*, *CmGA2ox3* und *CmGID1a* besaßen zur Standardherstellung durch Herausschneiden eines Fragments keine geeigneten Restriktionsschnittstellen. Daher wurde ein verkürztes Konstrukt durch Ligation von 2 Fragmenten des Gens hergestellt. Als Template diente dabei ebenfalls das jeweilige in pBluescript II SK klonierte Genfragment, welches mindestens den offenen Leserahmen umfasste.

Für die *CmGA3ox3*, die in reverser Orientierung im pBluescript II SK vorlag, war eine *BamHI*-Schnittstelle sowohl im Geninsert an der Position 728 bp als auch in der MCS des pBluescript II SK vorhanden. Das erste Fragment wurde daher durch Verdau des Plasmids mit *BamHI* erzeugt. Das zweite Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Kap. 2.8.1), wobei ein genspezifischer Primer (Kap. 6.1) erstellt wurde, der eine *BamHI*-Schnittstelle enthielt und 233 bp von der *BamHI*-Schnittstelle (Position 728 bp) entfernt an das Fragment band. Dieser Primer wurde mit dem vektorspezifischen Primer M13-Forward zur Amplifizierung des 3'-Bereichs eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (Kap. 2.4.3) und in pJet1.2 ligiert (Kap. 2.5.3). Das pJet1.2-Konstrukt wurde darauf mit *BamHI*, Schnittstelle des genspezifischen Primers, geöffnet und das erste Fragment wurde in das Konstrukt ligiert (Kap. 2.5.3) und in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert (Kap. 2.6.3). Da die Ligation des Fragments nicht gerichtet war, wurden die Klone mittels PCR identifiziert, in denen die Fragmente korrekt zueinander orientiert vorlagen. Mit den Enzymen *XhoI* und *EcoRI* wurde das komplette Fragment aus pJet1.2 herausgeschnitten (Kap. 2.5.1), da das Fragment nicht in der für die Herstellung der Standard-RNA benötigten Orientierung zu dem T₇-Promotor

vorlag. Das Fragment wurde anschließend in pBluescript II SK mit komplementären Enden ligiert (Kap. 2.5.3; Abb. 2.6) und in GM2163 transformiert (Kap. 2.6.3).

Für die Herstellung des *CmGA2ox2*-Standards wurde mit dem bei der Klonierung des offenen Leserahmens verwendeten Forward-Primer (Kap. 2.9.3, Kap. 6.1) und einem genspezifischen Reverse-Primer (Kap. 6.1) ein 575 bp großes Fragment amplifiziert (Kap. 2.8.1). Der Forward-Primer enthielt dabei eine Schnittstelle für *HincII* und der Reverse-Primer für *PstI*. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *HincII* und *PstI* verdaut (Kap. 2.5.1) und die DNA aufgereinigt (Kap. 2.4.3). Das zweite Fragment wurde durch Restriktion des in pBluescript II SK klonierten offenen Leserahmens mit *HincII* und *PstI* erzeugt. *HincII* wurde zur Klonierung des 5'-Bereichs des offenen Leserahmens in pBluescript II SK verwendet und *PstI* schnitt das Fragment an der Position 747 bp. Damit wurde der 5'-Bereich bis zu der Position 746 bp aus dem Plasmid entfernt. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente (Kap. 2.3.3) und Extraktion der geöffneten Plasmid-DNA (Kap. 2.4.2) wurde das erste Fragment in das pBluescript II SK-Konstrukt ligiert (Kap. 2.5.3; Abb. 2.6) und in XL1-Blue transformiert (Kap. 2.6.3).

Zur Herstellung des *CmGA2ox3*-Standards wurden 2 Fragmente amplifiziert. Dazu wurde der Bereich von 1 – 493 bp mit dem bei der Klonierung des offenen Leserahmens verwendeten Forward-Primer (Kap. 2.9.3, Kap. 6.1) und einem genspezifischen Reverse-Primer (Kap. 6.1), der eine *BamHI*-Schnittstelle enthielt, amplifiziert (Kap. 2.8.1). Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (Kap. 2.4.3) und in pJet1.2 ligiert (Kap. 2.5.3). Anschließend wurde das Hybridplasmid mit *BamHI* und *XbaI*, welches in der MCS des pJet1.2 schnitt, geöffnet (Kap. 2.5.1). Das zweite Fragment wurde mit einem an der Position 644 bp – 664 bp bindenden genspezifischen Forward-Primer (Kap. 6.1) und dem bei der Klonierung des offenen Leserahmens verwendeten Reverse-Primer (Kap. 2.9.3, Kap. 6.1) amplifiziert. Der Forward-Primer enthielt eine *BamHI*-Schnittstelle und der Reverse-Primer eine *XbaI*-Schnittstelle, weswegen das PCR-Produkt nach Aufreinigung mit diesen Enzymen verdaut wurde. Anschließend wurde das Fragment in das geöffnete Hybridplasmid des in pJet1.2 klonierten *CmGA2ox3*-Fragments ligiert (Kap. 2.5.2; Abb. 2.6) und in XL1-Blue transformiert (Kap. 2.6.3).

Dementsprechend wurden für die Herstellung des *CmGID1a* der 5'-Bereich und der 3'-Bereich des in pBluescript II SK klonierten Fragments amplifiziert. Dazu wurde der Bereich von 1 – 480 bp mit den bei der Klonierung verwendeten Forward-Primer (Kap. 6.1, Forward-1) und einem genspezifischen Reverse-Primer (Kap. 6.1, Reverse-1) amplifiziert (Kap. 2.8.1). Der Forward-Primer enthielt eine *BamHI*- und der Reverse-Primer eine *PstI*-Schnittstelle, so dass das PCR-Produkt nach Aufreinigung (Kap. 2.4.3) mit diesen Enzymen verdaut wurde (Kap. 2.5.1) und in mit diesen Enzymen geöffneten pBluescript II SK ligiert wurde (Kap. 2.5.3). Mit einem genspezifischen Forward-Primer (Kap. 6.1, Forward-2) und dem bei

der Klonierung des Genfragments verwendeten Reverse-Primer (Kap. 6.1, Reverse-2) wurde der Bereich von 664 – 1064 bp amplifiziert (Kap. 2.8.1). Der verwendete Forward-Primer enthielt eine *Pst*I-Schnittstelle und an der Position 398 bp des amplifizierten Fragments war eine weitere Schnittstelle des Enzyms vorhanden. Das PCR-Produkt wurde mit *Pst*I verdaut (Kap. 2.5.1) und in das mit *Pst*I geöffnete Hybridplasmid des in pBluescript II SK klonierten 5'-Bereichs ligiert (Kap. 2.5.3; Abb. 2.6) und in XL1-Blue transformiert (Kap. 2.6.3). Eine Übersicht über die verwendeten Standardklone ist in der Tabelle 2.4 dargestellt.

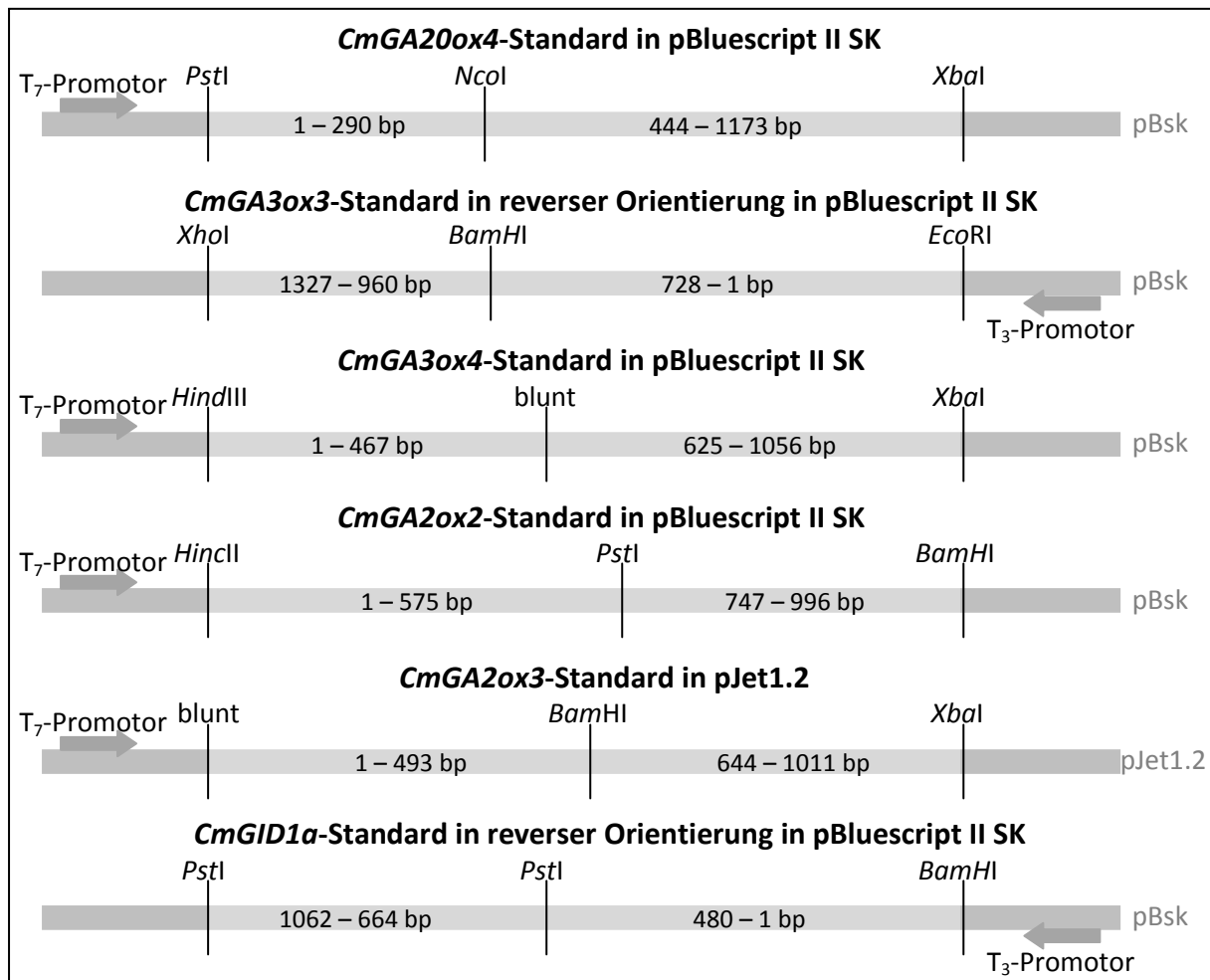


Abb. 2.6: Übersicht über die erstellten Standardklone; die dargestellten Größen beziehen sich auf den jeweiligen 5'- und 3'-Bereich des Originalklons, der zur Erstellung der Standards verwendet wurde

In vitro Transkription

Die *in vitro* Transkription ermöglicht eine Umschreibung einer DNA-Sequenz in RNA und somit die Erstellung von interner Standard-RNA für die kompetitive RT-PCR. Dazu wurden die Klone auf LB-Agarplatten (50 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen, mit einer Einzelkolonie eine Suspensionskultur (50 µg/ml Carbenicillin) angeimpft (Kap. 2.2.3) und die Plasmid-DNA

isoliert (Kap. 2.4.1). Die Fragmente der an der Gibberellin-Biosynthese und der Gibberellin-Signaltransduktion beteiligten Gene lagen dabei in den Vektoren pJet1.2 bzw. pBluescript II SK vor, welche Promotoren für DNA-abhängige RNA-Polymerasen besitzen. Für die *in vitro* Transkription der in pJet1.2 ligierten Fragmente wurde die T₇-Polymerase verwendet, wogegen für die in pBluescript II SK ligierten Fragmente je nach Orientierung des Geninserts die T₃- oder T₇-Polymerase benutzt wurde (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Übersicht über die für die Herstellung von Standard-RNA verwendeten Hybridplasmide

Gen	Vektor	Insert	Linearisierung	Promotor
<i>CmGA7ox</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA7ox</i> + 187 bp Intron	<i>EcoRI</i>	T ₇
<i>CmGA20ox3</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA20ox3</i> – 298 bp	<i>XhoI</i>	T ₃
<i>CmGA20ox4</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA20ox4</i> – 154 bp	<i>XbaI</i>	T ₇
<i>CmGA3ox1</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA3ox1</i> + ca. 150 bp Intron	<i>BamHI</i>	T ₇
<i>CmGA3ox2</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA3ox2</i> – 120 bp	<i>XbaI</i>	T ₇
<i>CmGA3ox3</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA3ox3</i> – 230 bp	<i>XhoI</i>	T ₃
<i>CmGA3ox4</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA3ox4</i> – 158 bp	<i>XbaI</i>	T ₇
<i>CmGA2ox1</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA2ox1</i> – 448 bp	<i>Bsp120I</i>	T ₃
<i>CmGA2ox2</i>	pBluescript II SK	<i>CmGA2ox2</i> – 157 bp	<i>BamHI</i>	T ₇
<i>CmGA2ox3</i>	pJet1.2	<i>CmGA2ox3</i> – 150 bp (+ 6 bp <i>BamHI</i>)	<i>HincII</i>	T ₇
<i>CmGID1a</i>	pBluescript II SK	<i>CmGID1a</i> – 183 bp (+ 6 bp <i>PstI</i>)	<i>EcoRV</i>	T ₃
<i>CmGID1b</i>	pBluescript II SK	<i>CmGID1b</i> – 147 bp	<i>BamHI</i>	T ₇
<i>CmGAIPa</i>	pJet1.2	<i>CmGAIPa</i> – 210 bp	<i>XbaI</i>	T ₇
<i>CmGAIPb</i>	pJet1.2	<i>CmGAIPb</i> – 227 bp	<i>XbaI</i>	T ₇

Die Hybridplasmide wurden vor der RNA-Synthese mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert (Kap. 2.5.1), was als Endpunkt für die Reaktion diente. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend über Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.3.3), die DNA aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.4.2) und zur RNA-Synthese im folgenden Standardansatz in einem 250 µl Reaktionsgefäß verwendet.

Linearisierte Plasmid-DNA	1 µg
NTPs (jeweils 10 mM)	2 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
5x RNA-Polymerasepuffer	4 µl
T ₃ - bzw. T ₇ -Polymerase (20U/µl)	2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C im Thermocycler. Anschließend wurde die enthaltende DNA verdaut (Kap. 2.5.5) und die RNA wurde präzipitiert (Kap. 2.3.4).

Die Erstellung der einzelnen für die kompetitive RT-PCR benötigten Konzentrationen an Standard-RNA erfolgte durch Verdünnung mit einer 100 ng/µl GADPH-RNA-Lösung (1,3 kb; Control RNA, Fermentas). Dadurch lag die Control-RNA zwischen 10³- und 10¹²-fach höher konzentriert als die Standard-RNA vor, so dass die Wahrscheinlichkeit eines Abbaus der Standard-RNA durch RNasen minimiert wurde. Die erstellten Verdünnungen wurden aliquotiert und bis zur Verwendung als interner Standard für die kompetitive RT-PCR bei -70°C gelagert.

2.10.2 Überprüfung der Spezifität der kompetitiven RT-PCR

Die Gibberellin-Dioxygenasen, die Gibberellin-Rezeptoren sowie die DELLAs gehören Multigenfamilien an, deren Mitglieder in vielen Bereichen hohe Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Daher wurde die Spezifität der durchgeführten RT-PCR zur Quantifizierung der Transkriptgehalte überprüft, um die zusätzliche Amplifizierung der anderen Gibberellin 20-Oxidasen, Gibberellin 3-Oxidasen, Gibberellin 2-Oxidasen, Gibberellin-Rezeptoren bzw. DELLAs als potenzielle Fehlerquelle auszuschließen.

Dazu wurde eine PCR mit den bei der RT-PCR verwendeten genspezifischen PCR-Primern durchgeführt. Als Template wurde jeweils 1 ng Plasmid-DNA verwendet, die als Insert mindestens den kodierenden Bereich der Gibberellin-Dioxygenasen, der Gibberellin-Rezeptoren bzw. der DELLAs enthielt.

Mit den genspezifischen Primern für die Quantifizierung der *CmGA2ox2* wurde selbst nach Erhöhung der Annealingtemperatur und somit der Bindungsspezifität der Primer ein Fragment der *CmGA2ox3* amplifiziert. Daher wurden in einer nachfolgenden RT-PCR mit den genspezifischen *CmGA2ox2*-Primern verschiedene Mengen an Standard-RNA der *CmGA2ox3* eingesetzt, um den Bereich zu bestimmen, in dem eine ausschließliche Quantifizierung der *CmGA2ox2*-Transkripte möglich ist. Es zeigte sich, dass unterhalb von

100 fg keine Signale sichtbar waren. Somit würden ermittelte Transkriptgehalte unterhalb von 100 fg lediglich der *CmGA2ox2* entsprechen, was mit der in dieser Arbeit maximal eingesetzten Menge an Standard-RNA übereinstimmt.

Entsprechend wurde der verwendbare Bereich für die *CmGAIPa* und *CmGAIPb* bestimmt, welche ebenfalls eine unspezifische Bindung bei Verwendung von Plasmid-DNA aufwiesen. Unterhalb von 10 pg ist ausschließlich das zu untersuchende Transkript sichtbar. Die maximal eingesetzte Menge an Standard-RNA für *CmGAIPa* bzw. *CmGAIPb* in dieser Arbeit beträgt 1 pg und liegt somit innerhalb des ermittelten Bereichs.

2.10.3 Quantifizierung der Transkriptgehalte

Zur Quantifizierung des Transkriptgehalts wurden mehrere RT-PCR-Ansätze, mindestens drei, für eine Proben-RNA durchgeführt. Dabei wurde in jedem Ansatz die gleiche Menge Gesamt-RNA (Kap. 6.5), aber unterschiedliche Mengen an Standard-RNA eingesetzt. Die Ansätze wurden nach erfolgter RT-PCR mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.3.3). Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung der Intensität der im Gel sichtbaren

Tab. 2.5: Größen der bei der RT-PCR amplifizierten Fragmente des Transkripts und des Standards

Gen	Größe der Transkriptbande	Größe der Standardbande
<i>CmGA7ox</i>	913 bp	1100 bp
<i>CmGA20ox3</i>	1170 bp	872 bp
<i>CmGA20ox4</i>	1094 bp	940 bp
<i>CmGA3ox1</i>	901 bp	ca. 1050 bp
<i>CmGA3ox2</i>	935 bp	815 bp
<i>CmGA3ox3</i>	1193 bp	963 bp
<i>CmGA3ox4</i>	975 bp	817 bp
<i>CmGA2ox1</i>	1132 bp	684 bp
<i>CmGA2ox2</i>	943 bp	786 bp
<i>CmGA2ox3</i>	922 bp	778 bp
<i>CmGID1a</i>	1043 bp	866 bp
<i>CmGID1b</i>	983 bp	836 bp
<i>CmGAIPa</i>	1891 bp	1681 bp
<i>CmGAIPb</i>	1484 bp	1257 bp

Transkript- und Standardbanden (Tab. 2.5) mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ 1.38x (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, USA, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>, 1997 – 2009).

Zur Quantifizierung wurden die ermittelten Bildpixel der Transkriptbande zu den Pixeln der Standardbande eines RT-PCR-Ansatzes ins Verhältnis gesetzt (Freeman et al., 1999). Die Quotienten der für eine Proben-RNA durchgeführten Ansätze wurden gegen die jeweilige im Ansatz eingesetzte Standardmenge aufgetragen (Abb. 2.7).

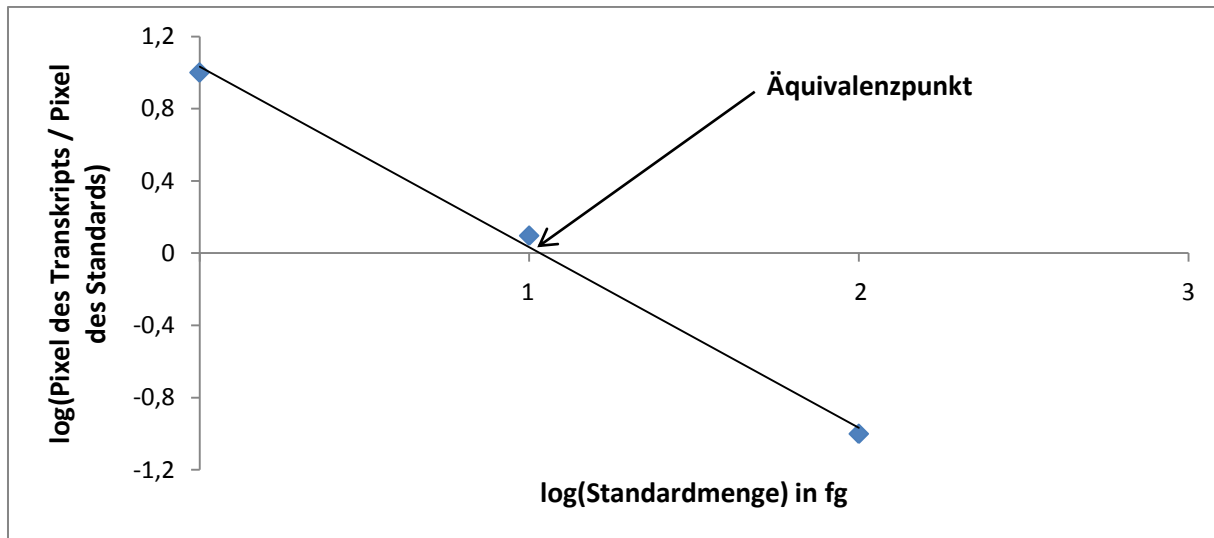


Abb.2.7: Quantifizierung des Transkriptgehalts durch Ermittlung des Äquivalenzpunktes von Transkript und Standard; dargestellt sind 3 RT-PCR-Ansätze mit konstanter Menge an Proben-RNA und unterschiedlicher Standardmenge von 1 fg, 10 fg und 100 fg

Durch lineare Regression wurde der Schnittpunkt mit der X-Achse bestimmt, der dem Äquivalenzpunkt von Transkript zu Standard entspricht. Somit konnte der in den Ansätzen enthaltene Transkriptgehalt durch Bestimmung der Standardmenge an diesen Punkt quantifiziert werden. Durch Einbeziehung der eingesetzten Menge an Gesamt-RNA des untersuchten Gewebes wurde der Transkriptgehalt pro $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA ermittelt.

Des Weiteren ermöglichte die Auswertung eine Überprüfung der Korrektheit der durchgeführten RT-PCR. Die bei der linearen Regression ermittelte Steigung erlaubte eine Aussage über die Effizienz für die Amplifizierung des Standards und des Transkripts. Bei einer Steigung von ungefähr $|1|$ war die Effizienz für beide identisch, wogegen bei einer Steigung $< |1|$ die Effizienz zu Gunsten des Transkripts und bei $> |1|$ zu Gunsten des Standards lag. Damit konnten eventuell auftretende Fehler bei Erstellung der Standardverdünnungen oder Pipettierfehler bei der Durchführung der RT-PCR sichtbar gemacht werden.

2.11 allgemeine biochemische Methoden

2.11.1 Aufreinigung über Sep-pak-Kartuschen

Die Inkubationsansätze (Enzymassay, Kap. 2.12) bzw. die methylierten Gibberellin-Extrakte (Quantifizierung der endogenen Gibberelline, Kap. 2.13) wurden über C₁₈-„reverse phase“ Sep-pak-Kartuschen (Waters, Eschborn) aufgereinigt. Die Probe wurde dazu in 100 µl Methanol aufgenommen, mit 2 ml (Enzymassay) bzw. 5 ml (Quantifizierung der endogenen Gibberelline) essigsauerm Wasser (pH 3,2) versetzt und auf eine mit 10 ml Methanol konditionierte und mit 10 ml essigsauerm Wasser (pH 3,2) äquilibrierte Kartusche geladen. Anschließend wurde das Probengefäß mit 2 ml (Enzymassay) bzw. 5 ml (Quantifizierung der endogenen Gibberelline) essigsauerm Wasser gespült und die Flüssigkeit ebenfalls auf die Kartusche gegeben. Die Kartusche wurde mit 10 ml essigsauerm Wasser (pH 3,2) gespült und die gebundenen Gibberelline wurden darauf mit 4 ml (Enzymassay) bzw. 6 ml (Quantifizierung der endogenen Gibberelline) Methanol von der Kartusche eluiert. Das Eluat wurde unter einem Luftstrom getrocknet.

2.11.2 Methylierung

Die Gibberelline wurden in leicht flüchtige Derivate überführt, um ohne Zersetzung während der Gaschromatographie in die Gasphase übergehen zu können. Dazu wurden zunächst die Carboxylgruppen durch Diazomehtan (Herstellung nach De Boer und Backer, 1954) methyliert.

Die getrockneten Fraktionen der HPLC (Enzymassay, Kap. 2.12) bzw. die getrockneten Gibberellin-Extrakte (Quantifizierung der endogenen Gibberelline, Kap. 2.13) wurden in 100 µl Methanol gelöst, mit ca. 50 µl Diazomethan versetzt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter einem Luftstrom getrocknet. Die Methylierung der Proben wurde einmal wiederholt.

2.11.3 Silylierung

Zusätzlich zu der im Kapitel 2.11.2 beschriebenen Methylierung erfolgte eine Silylierung der Gibberelline mit *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA). Dazu wurde die

getrockneten Probe viermal in je 50 µl Methanol aufgenommen und in eine aus einer Pasteurpipette (Hirschmann Laborgeräte) gezogene Ampulle überführt. Die Probe wurde unter einem Vakuum (Exsikkator Glaswerk Wertheim) getrocknet und anschließend mit 2 µl MSTFA gelöst. Die Ampulle wurde verschlossen und 30 min bei 80°C inkubiert.

2.11.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Gibberelline wurden durch die HPLC nach ihrer Polarität voneinander getrennt. Dazu wurde eine Anlage bestehend aus zwei Laufmittelpumpen (510 und 501; Waters, Eschborn), gesteuert über den Waters Automated Gradient Controller, verwendet. Zur groben Auftrennung und Reinigung der Gibberelline diente eine Polygosil 60-10 C₁₈-„reverse phase“-Vorsäule mit einer Partikelgröße von 10 µm (Waters, Eschborn) und zur anschließenden Trennung eine C₁₈-„reverse phase“-Hauptsäule mit einer Partikelgröße von 4 µm (Waters, Eschborn).

Nach Vorspülen der beiden Pumpen sowie der Hauptsäule wurde die Probe mit einer Hamilton-Spritze über einen Rheodyne Injektor in eine Aufgabeschleife injiziert. Die Probe wurde anschließend durch Starten des HPLC-Programms über einen Filter auf die Vorsäule und schließlich auf die Hauptsäule gespült. Dazu wurden zwei unterschiedlich polare Fließmittel verwendet. Bei der Untersuchung der radioaktiv markierten Gibberelline (Enzymassay, Kap. 2.12) wurde für die Pumpe A eine Lösung aus gleichen Teilen essigsaurem Wasser (pH 3,2) und 100% Methanol hergestellt, wogegen bei der Fraktionierung der Gibberellin-Extrakte (Quantifizierung endogener Gibberelline, Kap. 2.13)

Tab. 2.6: Laufmittelgradient bei dem verwendeten HPLC-Programm; Pumpe A: essigsaures Wasser (pH 3,2) mit 100% Methanol (1 V:1 V für die Untersuchung radioaktiver Gibberelline bzw. 3 V:1 V für die Fraktionierung endogener Gibberelline); Pumpe B: 100% Methanol

radioaktive Gibberelline				endogene Gibberelline			
Zeit [min]	Pumpe A [%]	Pumpe B [%]	Gradienten-verlauf	Zeit [min]	Pumpe A [%]	Pumpe B [%]	Gradienten-verlauf
0	100	0	*	0	100	0	*
5	75	25	2	20	50	50	6
25	0	100	8	40	0	100	8
30	0	100	1	50	0	100	1
31	100	0	6	52	100	0	6

eine Lösung aus 3 Volumen essigsäurem Wasser (pH 3,2) und 1 Volumen 100% Methanol verwendet wurde. Für die Pumpe B wurde bei beiden Untersuchungen jeweils 100% Methanol eingesetzt.

Die Elution der Gibberelline erfolgte dabei über einen Lösungsmittelgradienten mit sinkender Polarität (Tab. 2.6, Abb. 2.8) bei einer Flussrate von 1 ml/min, so dass die Gibberelline nach abnehmender Polarität von der Säule eluiert wurden.

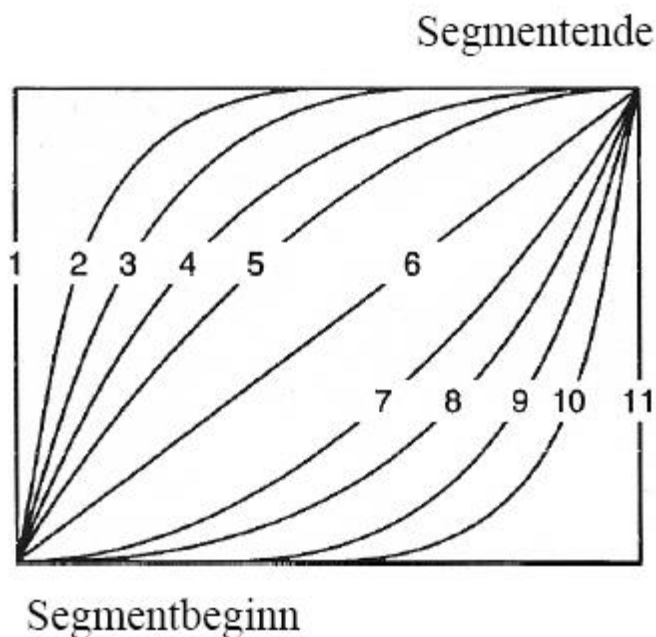


Abb. 2.8: gradielle Änderung der Laufmittelzusammensetzung

2.11.5 Kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Identifizierung der derivatisierten Proben erfolgte über einen Perkin Elmer AutoSystem XL Gaschromatographen, der mit einem TurboMass Massenspektrometer kombiniert war. Dazu wurde die in MSTFA gelöste Probe bei einer Temperatur von 60°C in eine SGE BPX5 Kapillarsäule (Länge: 30 m, Durchmesser: 0,25 mm, Dicke des Flüssigkeitsfilms: 0,25 µm; SGE, Großbritannien) des Gaschromatographen injiziert, der eine Verteilungschromatographie zwischen einer gasförmigen mobilen und einer flüssigen stationären Phase darstellt. Die Gibberelline wurden nach ihrem Siedepunkt durch schrittweise Erhöhung der Temperatur auf 360°C voneinander getrennt, mit einer Heliumflussrate von 1,5 ml/min von der GC-Säule eluiert und in die Ionenquelle der MS geleitet. In der MS wurde die Substanz durch Kollision mit energiereichen Elektronen ionisiert und fraktioniert. Die einfach positiv geladenen Ionen wurden über elektromagnetische Felder massenspezifisch getrennt und

detektiert, wobei die Intensität des Signals der relativen Häufigkeit des Ions entspricht. Für jede Substanz, somit für jedes Gibberellin, ergibt sich ein spezifisches Massenspektrum, welches zur Identifizierung dient.

Mit dem Computerprogramm TurboMass 5.4 wurden die Gaschromatogramme und Massenspektren zur Identifizierung sowie zur Quantifizierung der Gibberelline analysiert.

2.12 Enzymassay

Für die Untersuchung der enzymatischen Funktion der neuen Gibberellin-Dioxygenasen wurde der kodierende Bereich in den Vektor pUC18 kloniert (Kap. 2.12.1), der einen induzierbaren *lac*-Promotor besitzt und somit die Bildung rekombinanter Proteine erlaubt. Das Fragment musste dabei im korrekten Leserahmen im pUC18 vorliegen, um die Herstellung von funktionellen Proteinen zu ermöglichen.

Dazu wurden genspezifische Primer hergestellt, die für ein orientiertes Klonieren Restriktionsschnittstellen enthielten. Anschließend wurden die Klone zur Herstellung der rekombinanten Proteine verwendet (Kap. 2.12.2) und die Proteine mit dem Substrat inkubiert (Kap. 2.12.3). Die gebildeten Produkte wurden mittels HPLC detektiert und mittels GC-MS identifiziert (Kap. 2.12.4, Kap. 2.12.5).

2.12.1 Klonierung des kodierenden Bereichs in einen Expressionsvektor

Der kodierende Bereich wurde mittels PCR (Kap. 2.8.1) unter Verwendung der genspezifischen Primer (Kap. 6.1) und der *Pfu*-Polymerase in einem 100 µl Ansatz amplifiziert. Dabei diente als Template Plasmid-DNA des klonierten offenen Leserahmens in pBluescript II SK (Kap. 2.9.3). Die Reaktion wurde bei einer Annealingtemperatur von 50°C für 30 sec und einer Elongationstemperatur von 72°C für 3 min durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde auf einem Gel aufgetrennt (Kap. 2.3.3) und die DNA des Fragments vom Gel extrahiert (Kap. 2.4.2). Zur Erzeugung komplementärer Enden für die Ligation wurde das jeweilige Fragment und der Vektor pUC18 mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen (Kap. 2.5.1) geschnitten. Die DNA wurde anschließend aus der Reaktion extrahiert (Kap. 2.4.3), das Fragment wurde in den Vektor ligiert (Kap. 2.5.3) und chemisch in den *E. coli*-Stamm NM522 transformiert (Kap. 2.6.3). Die Klone wurden in einer PCR mit den vektor-

spezifischen Primern bei einer Annealingtemperatur von 60°C überprüft. Positive Klone wurden in LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) über Nacht kultiviert (Kap. 2.2.3), die Plasmid-DNA extrahiert (Kap. 2.4.1) und die klonierten Fragmente mittels Restriktionsverdau (Kap. 2.5.1) überprüft.

2.12.2 Herstellung rekombinanter Proteine

Zur Herstellung von rekombinanten Proteinen wurden die Bakterienklone auf eine LB-Agarplatte (50 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert (Kap. 2.2.3). Eine Einzelkolonie wurde in 10 ml LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) überführt und die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 200 U/min im Schüttelwasserbad (Kap. 2.2.3) inkubiert. Anschließend wurde 1 ml dieser Vorkultur zu 50 ml auf 30°C erwärmtes 2x YT-Medium (50 µg/ml Carbenicillin; Zusammensetzung s. unten) gegeben und die Bakterien wurden bei 30°C und 200 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 – 1,0 kultiviert. Der Bakterienkultur wurde darauf IPTG (Endkonzentration 1 mM) hinzugegeben und die Suspension wurde weitere 2 h bei 30°C und 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur bei 5000 x g und 4°C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 0,5 ml Lysispuffer (Zusammensetzung s. unten) resuspendiert und die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem Wasserbad bei 20°C aufgetaut. Dabei wurde dieser Schritt dreimal wiederholt. Danach wurden 20 U DNaseI (Sigma) hinzugegeben und der Ansatz bei 22°C für 5 – 15 min inkubiert. Die Suspension wurde bei 30 000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2x YT-Medium

Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5g
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l
pH 7,0	

Lysispuffer

Tris/HCl	200 mM (pH 7,4)
DTT	10 mM
Lysozym	1mg/ml

2.12.3 Inkubation mit radioaktiv markierten Gibberellinen

Zur Untersuchung der enzymatischen Funktion der rekombinanten Gibberellin-Dioxygenasen wurden die Zelllysate (Kap. 2.12.2) mit [^{14}C]-markierten Gibberellinen (s. unten) inkubiert. Dazu wurde folgender Standardinkubationsansatz auf Eis pipettiert.

Kofaktoren-Mix (Zusammensetzung s. unten)	120 μl
[^{14}C]-markiertes Gibberellin	50 000 – 100 000 dpm
Zelllysate	ad 400 μl

Der Ansatz wurde für 16 h bzw. teilweise für 10 min bei 30°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1/10 Volumen Eisessig abgestoppt. Des Weiteren wurde für jede Kombination aus rekombinanten Protein und radioaktiv markierten Gibberellin ein Kontrollansatz durchgeführt. Dazu wurde der Inkubationsansatz aufgeköcht und das Enzym somit denaturiert.

markierte Gibberelline	Kofaktoren-Mix
[1-, 7-, 12-, 18- ^{14}C]GA ₁₂	2-Oxoglutarat 400 mM
[17- ^{14}C]GA ₂₄	Ascorbat 400 mM
[17- ^{14}C]GA ₉	Katalase 4 mg/ml
[17- ^{14}C]GA ₄	FeSO ₄ 2 mM
[17- ^{14}C]GA ₃₄	pH 7,0
[1-, 7-, 12-, 18- ^{14}C]GA ₁	

2.12.4 Aufreinigung, Fraktionierung, Derivatisierung und Analyse der Gibberelline

Die abgestoppten Inkubationsansätze (Kap. 2.12.3) wurden mit 10 Volumen Methanol gemischt, bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde mit 1 ml Methanol wiederholt, die vereinigten Überstände unter einem Luftstrom getrocknet und über C₁₈-„reverse phase“ Sep-pak-Kartuschen aufgereinigt (Kap. 2.11.1). Anschließend wurden die getrockneten Proben in 100 μl 100% Methanol gelöst, mit 100 μl essigsäurem Wasser (pH 3,2) versetzt und durch die HPLC fraktioniert (Kap. 2.11.4). Dabei wurden die radioaktiv markierten Gibberelline während des HPLC-Laufs mittels eines online Radioaktivitätsdetektors mit Feststoffsintillator detektiert. Dadurch konnten die einzelnen während der Inkubation gebildeten Produkte voneinander getrennt aufgefangen und in der

anschließenden GC-MS identifiziert werden. Dazu wurden die aufgefangenen Produkte unter einem Luftstrom getrocknet, methyliert (Kap. 2.11.2) und silyliert (Kap. 2.11.3) bevor sie mittels GC-MS analysiert wurden (Kap. 2.11.5).

2.12.5 Identifizierung der Gibberelline

Die Auswertung der Inkubationsansätze erfolgte mittels HPLC und GC-MS. Dabei konnte durch die bei der HPLC ermittelten Retentionszeiten der radioaktiven Gibberelline eine erste Aussage über eine Synthese von Produkten aus dem Substrat durch die rekombinanten Gibberellin-Dioxygenasen gemacht werden. Die genaue Identifizierung der gebildeten Gibberelline erfolgte anschließend mittels des Computerprogramms TurboMass 5.4 durch Bestimmung der Retentionszeiten des Gaschromatogramms und der Massenspektren, welche für die Gibberelline charakteristisch und bekannt sind.

2.13 Identifizierung und Quantifizierung endogener Gibberelline

2.13.1 Extraktion endogener Gibberelline

Für die Extraktion wurde das Pflanzenmaterial unter flüssigen Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben, 1 g des Materials wurde in ein Zentrifugenglas überführt und mit der dreifachen Menge eiskaltem 80% Methanol (w/v) versetzt. Um eine spätere Quantifizierung der extrahierten Gibberelline zu ermöglichen, erfolgte eine Zugabe von 4 µl eines Standardgemisches deuterierter 17,17-d₂-Gibberelline (von Prof. L. Mander, Canberra, Australien) je 1 g verwendetem Frischgewicht. Das Gemisch beinhaltete die deuterierten Gibberelline A₁₂-Aldehyd, A₁₂, A₁₅, A₂₄, A₉, A₄, A₃₄, A₅₁, A₂₀, A₁ und A₈ in einer Konzentration von je 0,5 ng/µl in Methanol. In den Ansätzen waren somit 2 ng/g Frischgewicht von jedem Gibberellin enthalten, wodurch eine Quantifizierung in einem Bereich von 0,2 – 20 ng/g Frischgewicht vorgenommen werden konnte. Für die Untersuchung der Stamina des Stadiums II und III wurde zusätzlich eine höher konzentrierte Lösung des deuterierten GA₉ sowie GA₄ hinzugegeben, so dass 10 ng/g Frischgewicht dieser Gibberellin-Standards im

Ansatz enthalten waren und eine Quantifizierung bis 100 ng/g Frischgewicht ermöglicht wurde. Entsprechend lag für das Hypanthium, die Sepalen und die Petalen des Stadiums III eine Konzentration von 10 ng/g Frischgewicht an GA₄-Standard im Ansatz vor.

Der Ansatz wurde 1 h auf Eis unter Schwenken inkubiert, für 5 min bei Raumtemperatur und 3000 U/min zentrifugiert (UJ 0) und der Überstand in ein sauberes Glas überführt. Das Pellet wurde dreimal mit der einfachen Menge (w/v) eiskaltem 80% Methanol resuspendiert, für 30 min auf Eis geschwenkt, 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand in das Glas überführt. Die vereinigten Überstände wurden anschließend unter einem Luftstrom bis zu einem wässrigen Anteil von ungefähr 1 ml eingeeengt. Die Probe wurde mit bidestillierten Wasser auf 3 ml aufgefüllt, mit 0,1 N KOH auf pH 8 eingestellt und viermal mit 1/3 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Zur Unterstützung der Phasentrennung erfolgte jeweils eine dreiminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 3000 U/min. Die obere, organische Phase wurde dabei jeweils verworfen.

Die wässrige Unterphase wurde mit 100% Essigsäure auf pH 3 eingestellt und viermal mit 1/3 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Dabei erfolgte jeweils eine Zentrifugation für 3 min bei 3000 U/min und eine Überführung der oberen Phase in ein sauberes Zentrifugenglas. Die vereinigten Überstände wurden einmal mit 1/4 Volumen essigsaurem Wasser (pH 3,2) gewaschen und unter einem Luftstrom getrocknet.

2.13.2 Aufreinigung, Fraktionierung, Derivatisierung und Analyse der Gibberelline

Die Gibberellin-Extrakte (Kap. 2.13.1) wurden methyliert (Kap. 2.11.2), über Sep-pak-Kartuschen gereinigt (Kap. 2.11.1) und anschließend mittels HPLC fraktioniert (Kap. 2.11.4). Dazu wurde die getrocknete Probe in 50 µl 100% Methanol gelöst, mit 150 µl essigsaurem Wasser (pH 3,2) versetzt und in die Aufgabeschleife der HPLC injiziert. Ab der Retentionszeit von 11,5 min wurde das Eluat durch einen Fraktionssammler aufgefangen. Dabei wurde jede Fraktion über einen Zeitraum von 2 min gesammelt und anschließend unter einem Luftstrom getrocknet. In der Tabelle 2.7 (Kap. 2.13.3) sind die Fraktionen, in denen die einzelnen Gibberelline identifiziert wurden, dargestellt. Anschließend wurden die getrockneten Fraktionen silyliert (Kap. 2.11.3) und direkt für die GC-MS-Analyse verwendet (Kap. 2.11.5).

2.13.3 Identifizierung und Quantifizierung der endogenen Gibberelline

Die Identifizierung der endogenen Gibberelline sowie die Quantifizierung der Gehalte erfolgte an Hand des Gaschromatogramms und des Massenspektrums mittels des Computerprogramms TurboMass 5.4. In der Tabelle 2.7 sind die spezifischen Retentionszeiten des Gaschromatogramms sowie die analysierten Ionenmassen des Massenspektrums der jeweiligen endogenen Gibberelline aufgeführt.

Tab. 2.7: Übersicht über die in den Fraktionen der HPLC identifizierten Gibberelline, der Retentionszeiten der Gibberelline in der GC und der charakteristischen Ionenmassen der Gibberelline; die zur Quantifizierung benutzten Ionenpaare sind hervorgehoben

Gibberellin	Fraktion [min]	Retentionszeit [min]	Ionenmassen [MG]
			endogenes GA / 17,17-d2-GA
GA₁₂	45,5 – 47,5	11,53	241/243 285/287 300/302 330/332 360/362
GA₁₅	39,5 – 41,5	16,19	195/197 239/241 284/286 312/314 344/346
GA₂₄	41,5 – 43,5	13,20	227/229 243/245 286/288 298/300 314/316 342/344
GA₉	39,5 – 41,5	11,45	227/229 243/245 270/272 298/300 340/342
GA₄	33,5 – 35,5	13,41	225/227 233/235 261/263 284/286 289/291 328/330 418/420
GA₅₁	31,5 – 33,5		225/227 268/270 284/286 328/330 386/388
GA₃₄	29,5 – 31,5	15,02	215/217 223/225 229/231 261/263 288/290 506/508
GA₂₀	25,5 – 27,5	13,14	207/209 235/237 301/303 359/361 375/377 418/420
GA₁	17,5 – 19,5	15,08	207/209 235/237 313/315 376/378 448/450 506/508
GA₈	13,5 – 15,5	16,59	207/209 238/240 281/283 448/450 594/596

Die endogenen Gibberelline wurden durch Bestimmung der Peakfläche des deuterierten Standardions (P_S) und des unmarkierten endogenen Gibberellinions (P_E) quantifiziert. Dabei enthielt der deuterierte Standard einen bestimmten Anteil an unmarkierten Ionen (Tab. 2.8), so dass dieser Anteil der ermittelten Peakfläche des endogenen Gibberellinions abgezogen werden musste.

Des Weiteren musste das Auftreten der Isotope ^{13}C , ^{29}Si und ^{30}Si (aus der Trimethylsilylierung), die zu einer Erhöhung der detektierten Masse für den Standard führen, berücksichtigt werden. Diese Isotope treten dabei mit einer bekannten Wahrscheinlichkeit

auf, so dass für jedes Gibberellin ein Korrekturfaktor (Tab. 2.8) berechenbar ist (Budzikiewicz, 1980).

Tab. 2.8: unmarkierter und markierter Ionenanteil der benutzten 17,17-d2-GA-Standards sowie Korrekturfaktoren der Gibberelline

Gibberellin	Ionenpaar [MG]	unmarkierter Anteil	markierter Anteil	Korrekturfaktor
GA₁₂	302/300	227626	387	2,84
GA₁₅	241/239	127019	2965	2,58
GA₂₄	316/314	53458	1783	2,84
GA₉	300/298	182000	501	2,34
GA₄	420/418	113689	339	7,40
GA₅₁	270/268	458060	2823	7,40
GA₃₄	508/506	63700	257	12,89
GA₂₀	420/418	188825	735	7,40
GA₁	508/506	215044	300	12,89
GA₈	596/594	186908	526	18,80

Die Berechnung wurde somit wie nachfolgend dargestellt durchgeführt.

Die ermittelten Peakflächen des markierten (P_M) und unmarkierten Ions (P_U) setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

$$P_U = P_E + P_{US}$$

$$P_M = P_S + P_{ME}$$

- P_E : Peakfläche des endogenen Gibberellinions
- P_M : Peakfläche des markierten Ions
- P_{ME} : Peakfläche des markierten endogenen Gibberellinions
- P_S : Peakfläche des Standardions
- P_U : Peakfläche des unmarkierten Ions
- P_{US} : Peakfläche des unmarkierten Standardions

Damit wird die Peakfläche des endogenen Gibberellinions (P_E) durch Substration der Peakfläche des unmarkierten Standardions von der Peakfläche des unmarkierten Ions bestimmt. Dabei ist der Anteil an unmarkierten Standardionen von der Peakfläche des deuterierten Standards abhängig.

$$P_E = [P_U - (\text{unmarkierter Anteil} / \text{markierter Anteil} \cdot P_M)]$$

Die Isotope, welche zu einer Erhöhung der detektierten Masse führen, besitzen folgende Wahrscheinlichkeit (Budzikiewicz, 1980):

$$1 \times {}^{30}\text{Si} = 3,35\%$$

$$2 \times {}^{13}\text{C} = 1,25\%$$

$$1 \times {}^{13}\text{C} = 1,12\%$$

$$1 \times {}^{29}\text{Si} = 5,10\%$$

Daraus lässt sich der Korrekturfaktor (k) bestimmen:

$$k = [y \cdot 3,35\%] + [0,0125 \cdot 0,5z (z - 1)] + [1,12z \cdot 0,051y]$$

y : Anzahl der Si-Atome

z : Anzahl der C-Atome

Somit wird die Peakfläche des Standardions durch Substration des Anteils der Isotope ${}^{30}\text{Si}$, ${}^{13}\text{C}$ und ${}^{29}\text{Si}$ bestimmt. Dabei ist das Auftreten der Isotope von dem Gehalt des endogenen Gibberellins und somit von dessen Peakfläche abhängig.

$$P_s = [P_M - (P_U \cdot k \cdot 0,01)]$$

Die Berechnung des endogenen Gibberellin-Gehaltes wurde somit durch folgende Formel durchgeführt:

$$\text{endogener GA-Gehalt [ng/g]} = \frac{P_E}{P_s} \cdot \frac{\text{eingesetzte Standardmenge [ng]}}{\text{eingesetztes Frischgewicht [g]}}$$

2.14 Virus induziertes Gen-Silencing (VIGS)

Es wurde ein von der Arbeitsgruppe von S.P. Dinesh-Kumar erstelltes auf den Tobacco Rattle Virus (TRV) basierendes binäres Vektorsystem zur Infizierung und zum Gen-Silencing der Pflanzen verwendet (Liu et al., 2002a). Dabei lag das cDNA-Fragment der RNA1 in dem T-DNA-Vektor pYL44 (Derivat von pBIN19) und das cDNA-Fragment der RNA2 in dem T-DNA-Vektor pCAMBIA0390 vor (Kap. 1.2.1).

2.14.1 Erstellung des TRV-Konstrukts

Es wurde ein cDNA-Fragment der Phytoene-Desaturase (PDS), ein an der Carotinoid-Biosynthese beteiligtes Gen, in den TRV-Vektor pYL156 (RNA2) kloniert. Dazu wurde in einer Reversen Transkription unter Verwendung von Oligo(dT)₁₈-Primern aus Spross-RNA 7 Tage alter Kürbiskeimlinge cDNA synthetisiert (Kap. 2.7). Diese diente als Template zur Amplifizierung des Fragments. Dabei wurde 1 µl der cDNA in einem in Kapitel 2.8.2 dargestellten 10 µl PCR-Ansatz unter Verwendung der *Taq*-Polymerase eingesetzt. Da die Sequenz der *CmPDS* nicht bekannt war, wurden auf Grundlage bekannter PDS-Sequenzen (*Citrullus lanatus*: EF159942, *Nicotiana benthamiana*: DQ469932, *Pisum sativum*: AJ621573, *Momordica charantia*: AY494790) degenerierte Primer (Kap. 6.1) erstellt und je 0,4 µl einer 50 µM-Verdünnung bei der PCR verwendet. Bei dem verwendeten Temperaturprogramm wurde der Annealingschritt für 30 sec bei 55°C und die Elongation für 30 sec bei 72°C durchgeführt. Anschließend wurden 2,5 µl einer 1:50-Verdünnung des PCR-Produkts in einem 50 µl PCR-Ansatz reamplifiziert, das PCR-Produkt auf einem Gel aufgetrennt (Kap. 2.3.3), die DNA aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.4.2), in pJet1 ligiert (Kap. 2.5.3) und in XL1-Blue transformiert (Kap. 2.6.3). Die Sequenz wurde mittels Sequenzierung ermittelt (Kap. 2.3.5) und überprüft. Das in pJet1 enthaltene PDS-Fragment wurde mit *Xba*I und *Xho*I herausgeschnitten, in den mit denselben Enzymen geschnittenen pYL156 ligiert (Kap. 2.5.3) und in elektrokompente *E. coli* transformiert (Kap. 2.6.2). Das Hybridplasmid wurde aus den Zellen extrahiert (Kap. 2.4.1) und in elektrokompente *A. tumefaciens* transformiert (Kap. 2.6.2).

2.14.2 Infizierung der Pflanzen

Für die Infizierung der Pflanzen mit den TRV-Konstrukten wurden unterschiedliche Methoden verwendet, die nachfolgend dargestellt sind.

Agroinfiltration

Bei der Agroinfiltration wurde eine Bakteriensuspension in die Unterseiten der Blätter von *N. benthamiana* bzw. der Kotyledonen von *C. maxima* sowie *C. sativus* injiziert. Dazu wurden die Agrobakterienklone pTRV1, pYL156 und *CmPDS*-pYL156 auf jeweils einer LB-Agarplatte (Kap. 2.2.3) ausgestrichen und bei 28°C über Nacht kultiviert. Je eine Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Rifampicin) überführt

und bei 28°C und 200 U/min im Schüttelwasserbad für ca. 20 h inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine 1:5000-Verdünnung in LB-Medium mit den unten aufgeführten Zusätzen angesetzt und bei 28°C und 200 U/min im Schüttelwasserbad für ca. 16 – 24 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,0 kultiviert. Die Zellen wurden bei 3000 x g und 4°C geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Infiltrationsmedium (Zusammensetzung s. unten) resuspendiert, wobei eine OD₆₀₀ von 2 eingestellt wurde. Dazu wurde eine 1:2-Verdünnung der Suspension vermessen, die eine OD₆₀₀ von ca. 1 aufweisen musste. Die Bakteriensuspensionen wurden bei 22°C und 100 U/min im Schüttelwasserbad für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen des pTRV1 und pYL156 bzw. des pTRV1 und *CmPDS*-pYL156 1:1 vermischt und mit einer Spritze ohne Kanüle in die Unterseite der Blätter injiziert. Dabei wurden die vollständig entwickelten Blätter von *N. benthamiana* des 6-Blattstadiums bzw. die Kotyledonen von 7 Tage alten *C. maxima* und *C. sativus* infiziert.

Zusätze im LB-Medium

Saccharose	0,5 %
MgSO ₄	2 mM
MES (pH 5,6)	10 mM
Acetosyringone	20 µM
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	25 µg/ml

Infiltrationsmedium

1 x Murashige und Skoog Medium	
Saccharose	2 %
MES (pH 5,6)	10 mM
Acetosyringone	200 µM

Wachstum im Infiltrationsmedium

Für die Klone pTRV1, pYL156 und *CmPDS*-pYL156 wurden wie für die Agroinfiltration beschrieben (Seite 65) Bakteriensuspensionen mit Infiltrationsmedium hergestellt. Nach zweistündiger Inkubation bei 22°C und 100 U/min im Schüttelwasserbad wurden die Bakteriensuspensionen des pTRV1 und pYL156 bzw. des pTRV1 und *CmPDS*-pYL156 1:1 vermischt und in sterile Plastikröhrchen gefüllt. Die 3 Tage, 5 Tage bzw. 7 Tage alten Kürbiskeimlinge wurden mit der kompletten Wurzel in die Suspension gesteckt. Alle 2 Tage wurde die Bakteriensuspension ausgetauscht. Nach 14 Tagen wurden die Pflanzen in Erde gefüllte Töpfe überführt.

Infizierung mit Virenpartikeln

Es wurden die vollständig entwickelten Tabakblätter mittels Agroinfiltration (Seite 65) mit dem Gemisch pTRV1 und pYL156 bzw. pTRV1 und *CmPDS*-pYL156 infiziert. Nach 4 Tagen wurden die infizierten Blätter geerntet und mit 50 mM Na-Phosphatpuffer

(Zusammensetzung s. unten) auf Eis homogenisiert. Dabei wurden 2 ml Puffer pro Blatt verwendet. Das Rohhomogenat wurde auf die Oberseite der mit Siliciumcarbid (200 – 400 Mesh) bestäubten Tabakblätter des 8-Blattstadiums bzw. der mit Siliciumcarbid bestäubten Kotyledonen 7 Tage alter *C. maxima* und *C. sativus* aufgetragen und vorsichtig eingerieben. Nach ungefähr 2 min wurden die Blätter bzw. die Kotyledonen mit sterilem, destilliertem Wasser abgespült.

Na-Phosphatpuffer

Lösung 1: 50 mM Natriumdihydrogenphosphat

Lösung 2: 50 mM di-Natriumhydrogenphosphat
vereinigt, pH 7,2

Sprossinjektion

Die Agrobakterienklone pTRV1, pYL156 und *CmPDS*-pYL156 wurden je auf eine LB-Agarplatte (50 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Rifampicin; Kap. 2.2.3) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 28°C inkubiert. Die Bakterien des Klons pTRV1 wurden 1:1 mit den Bakterien des Klons pYL156 bzw. *CmPDS*-pYL156 auf der Platte gemischt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde das Hypokotyl bzw. der Spross der *C. maxima* und *C. sativus* verletzt und das Gemisch auf die Wunde appliziert. Die Behandlung wurde erstmals bei 6 Tage alten Keimlingen durchgeführt, bei denen das Hypokotyl infiziert wurde. Alle 3 Tage wurde die Infizierung wiederholt, wobei auch der Spross unterhalb der Blätter behandelt wurde. Nach 2 Wochen wurden die Stellen alle 7 Tage infiziert.

2.14.3 Nachweis der viralen RNA und der Transkripte

Zur Überprüfung der Verbreitung der viralen RNA wurden die Blätter der infizierten *C. maxima* bzw. *C. sativus* geerntet und die Gesamt-RNA extrahiert (Kap. 2.4.4). Anschließend wurde unter Verwendung des vektorspezifischen Reverse-Primers (pYL156-Reverse, Kap. 6.1) spezifisch cDNA zu der viralen RNA synthetisiert (Kap. 2.7). In der nachfolgenden PCR (Kap.2.8.1) wurde 1 µl der cDNA mit verschiedene Primerkombinationen der vektorspezifischen (pYL156-Forward, pYL156-Reverse; Kap. 6.1) und genspezifischen (PDS-Forward-1, PDS-Reverse-1; Kap. 6.1) Primer zum Nachweis von viraler cDNA eingesetzt.

Des Weiteren wurde cDNA mit Oligo(dT)₁₈-Primer synthetisiert (Kap. 2.7) und in einer PCR mit degenerierten Primern (Kap. 2.8.2) eingesetzt, die auf Grundlage bekannter Sequenzen

(*Citrullus lanatus*: EF159942, *Nicotiana benthamiana*: DQ469932, *Pisum sativum*: AJ621573, *Momordica charantia*: AY494790) erstellt wurden. Die Primer banden dabei an einen Bereich des PDS, welcher nicht zu der Erstellung des viralen Vektors benutzt wurde. Damit konnte ausschließlich das pflanzeigene PDS amplifiziert und gegebenenfalls ein posttranskriptionales Gen-Silencing nachgewiesen werden.

2.15 Chemikalien und Enzyme

Acetosyringone	Aldrich
Agarose	Biomol
Ascorbat	Merck
β -Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG
Carbenicillin	Biomol
Chloroform	Merck
CIAP mit 10x Puffer	Fermentas
Control-RNA	Fermentas
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fermentas
Diethylether	Riedek-de Haën
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fermentas
DNaseI mit 10x Reaktionspuffer (MgCl ₂)	Fermentas
DNaseI	Sigma
dNTPs	Fermentas
DTT	Biomol,
Eisensulfat	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylacetat	Merck
Ethylendinitrolotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylendinitrolotetraessigsäure (25 mM)	Fermentas
GA ₄	Sigma
GeneRuler® 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas,
GeneRuler® 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Gentamicin	Serva
D (+)-Glucose	Merck,

Glycerin	Sigma
Hefeextrakt	Roth,
Helium	Westfalen AG
IPTG	Roth
Hefeextrakt	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Kanamycin	Sigma
Katalase	Sigma
Klenow-Fragment mit 10x Puffer	Fermentas
LAB 150 978 (1-[4-trifluormethyl]-2-[1,2,4-tri- azolyl-(1)]- 3-[5-methyl-1,3-dioxan-5-yl]-propen-3-ol])	Dr. W. Rademacher; BASF, Limburger Hof
LB-Agar	Sigma
LB-Medium	Sigma
6x Loading Dye Solution	Fermentas
Lysozym	Biomol
Magnesiumchlorid (25 mM)	Fermentas
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Roth
MES	Biomol
Murashige & Skoog Medium	Duchefa Biochemie
Natriumacetat (Trihydrat)	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA)	Macherey-Nagel
<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosotoluen-4-solfonnanide	Aldrich
NTPs	Fermentas
Oligo(dT) ₁₈ Primer	Fermentas,
2-Oxoglutarat	Sigma
PEG 4000	Fermentas
<i>Pfu</i> -Polymerase	Fermentas,
Phenol (pH 4,3)	Biomol
Primer	Metabion GmbH oder biomers.net
Random Hexamer Primer	Fermentas
Restriktionsendonukleasen mit 10x Puffer	Fermentas
Reverse Transkriptase mit 5x Reaktionspuffer	Fermentas

RiboRuler® RNA Ladder, High Range	Fermentas
Rifampicin	Sigma
2x RNA Loading Dye Solution	Fermentas
RNase-Inhibitor (RNasin)	Fermentas
RNA-Polymerasepuffer (5x)	Fermentas
Saccharose	Fluka Chemie AG
Siliciumcarbid	Aldrich
Stickstoff (flüssig)	Linde
T ₃ - und T ₇ -RNA-Polymerase	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase mit 10x PCR-Puffer	Fermentas
T4 DNA-Ligase mit 10x Puffer	Fermentas
Tris	Biosolve LTD, Valkenswaard/NL
Trypton	Roth
Tween 20	Serva

2.16 Geräte

Autoklav	Wolf SANOclav; Schmidt, Braunschweig
Elektroporator	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GC-MS	Perkin-Elmer, USA
Flachbett-Gelapparatur	Biozym
Fraktionssammler, FRAC-100	Pharmacia Fine Chemicals
HPLC	Waters, Eschborn
Kühlzentrifuge	SIGMA 3K30, Osterode
online Radioaktivitätsdetektor	Packard
Photometer, GeneQuant 100	Healthcare Bio-Science
Photometer, Genezys 10UV	Thermo Spectromic
Schüttelwasserbad	GFL 1092, Gesellschaft für Labortechnik mbH
Schüttler	Laboratoriumsbedarf Ernst Schütt jr., Göttingen
Thermocycler	Techgene AG
Tischzentrifuge, Biofuge Pico	Heraeus; Kendro
Tischzentrifuge, UJ 0	Martin Christ, Osterode
UV-Tisch	Peglab
UV-Transilluminator	CN-TFX, Vilber Lourmat; Phase
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Gibberellin-Signalwege, bestehend aus Gibberellin-Biosynthese, Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion, während der Entwicklung von Keimlingen und männlichen Blüten der monözischen Kürbispflanze (*Cucurbita maxima* L.) untersucht. Dazu wurden neue Gibberellin-Dioxygenasen in der Wurzelspitze 7 Tage alter Kürbiskeimlinge identifiziert (Kap. 3.1) und charakterisiert (Kap. 3.2). Des Weiteren wurde die Expression der an der Gibberellin-Biosynthese, der Gibberellin-Perzeption sowie der Gibberellin-Signaltransduktion beteiligten Gene während der Entwicklung von Keimlingen (Kap. 3.3.1) und männlichen Blüten (Kap. 3.3.3) untersucht. Zu einer näheren Aufklärung der Biosynthese wurden zusätzlich in den männlichen Blüten die endogenen Gibberelline in den einzelnen Organen identifiziert und quantifiziert (Kap. 3.4).

Der Einfluss von Gibberellin auf die Expression der an den Gibberellin-Signalwegen beteiligten Gene (Kap. 3.3.2) sowie auf die vegetative und reproduktive Kürbisentwicklung (Kap. 3.5) wurde analysiert. Zu einer Untersuchung der exakten Funktion der Mitglieder der an den Gibberellin-Signalwegen beteiligten Multigenfamilien wurde die Etablierung eines Virus induzierten Gen-Silencing-Systems in Kürbis geprüft (Kap. 3.6).

3.1 Identifizierung und Klonierung von Gibberellin-Dioxygenasen aus Wurzelspitzen 7 Tage alter Kürbiskeimlinge

3.1.1 Identifizierung und Klonierung neuer Gibberellin-Dioxygenasen

Frühere Untersuchungen von Kürbiskeimlingen (*Cucurbita maxima* L.) zeigten, dass wichtige an der Gibberellin-Biosynthese beteiligte Enzyme in der Wurzelspitze unbekannt sind (Lange et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels PCR basierten `Screenings` (Kap. 2.9.1) Fragmente neuer Gibberellin-Dioxygenasen in Wurzelspitzen 7 Tage alter Kürbiskeimlinge identifiziert werden. Dabei wurde mit den Gibberellin 20-Oxidase-Primern ein Fragment einer neuen Gibberellin 20-Oxidase (*CmGA20ox4*), mit den Gibberellin 3-Oxidase-Primern ein Fragment einer neuen Gibberellin 3-Oxidase (*CmGA3ox4*) und mit den

Gibberellin 20/2-Oxidase-Primern ein Fragment einer neuen Gibberellin 2-Oxidase (*CmGA2ox3*) amplifiziert (Kap. 6.2).

Auf Grundlage der identifizierten Fragmente wurden die unbekannten 5'- und 3'-Bereiche der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4* und *CmGA2ox3* mittels RNA Ligase Mediated-RACE ermittelt. (Kap. 2.9.2). Dabei wurden jeweils mehrere unterschiedlich lange Produkte bei der 3'-RACE amplifiziert. Für die *CmGA20ox4* bzw. *CmGA3ox4* wurde lediglich das erwartete ca. 650 bp große PCR-Produkt und für die *CmGA2ox3* sowohl das ca. 820 bp als auch das ca. 900 bp große Fragment untersucht (Kap. 6.2). Die Sequenz der in der Länge variierenden 3'-RACE-Fragmente der *CmGA2ox3* ist identisch, wobei das größere Fragmente zusätzlich ein 75 bp langes Intron enthält.

Neben der neu identifizierten *CmGA2ox3* sind zwei weitere Gibberellin 2-Oxidasen in Kürbis bekannt. Dabei konnten bisher für die *CmGA2ox2* lediglich Transkripte, die ein 106 bp großes Intron enthielten, aus Kürbiskeimlingen isoliert werden (GenBank: AJ315662). Bei Verwendung von cDNA aus 7 Tage alten Kürbiswurzelspitzen konnten vergleichbar zu der *CmGA2ox3* sowohl das vollständig gesplicete als auch das Intron enthaltene Transkript der *CmGA2ox2* amplifiziert werden (Kap. 6.2).

In 7 Tage alten Wurzelspitzen konnten somit eine neue Gibberellin 20-Oxidase (*CmGA20ox4*), eine neue Gibberellin 3-Oxidase (*CmGA3ox4*), eine neue Gibberellin 2-Oxidase (*CmGA2ox3*) sowie die vollständig prozessierte Form der *CmGA2ox2* identifiziert werden. Dabei treten zusätzlich in diesem Keimlingsorgan unvollständig gesplicete Transkripte der *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* auf.

3.1.2 Sequenzen der Gibberellin-Dioxygenasen

Zur Ermittlung der vollständigen Sequenz der Transkripte der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4* und *CmGA2ox3* wurden jeweils die Sequenzen der separat voneinander durchgeführten Klonierungen des lesenden Bereichs (Kap. 2.9.3), des mit den degenerierten Primern erzeugten Fragments (Kap. 2.9.1, Kap. 3.1), der 5'-RACE und der 3'-RACE (Kap. 2.9.2, Kap. 3.1) verglichen. Damit wurde der lesende Bereich durch mindestens drei unabhängig durchgeführte Klonierungen und Sequenzierungen abgedeckt und mögliche auftretende Sequenzfehler durch die durchgeführten Methoden konnten berücksichtigt werden (Abb. 3.1).

Bei der *CmGA2ox2* dienten entsprechend die beiden Sequenzen des kodierenden Bereichs (Kap. 2.9.3, Kap. 3.1) und zusätzlich die Sequenz der *CmGA2ox2* inklusive Intron (GenBank: AJ315662) zur Identifizierung der korrekten Sequenz. Die vollständigen Nukleotid- und

Aminosäuresequenzen der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* sind im Anhang (Kap. 6.3) aufgeführt.

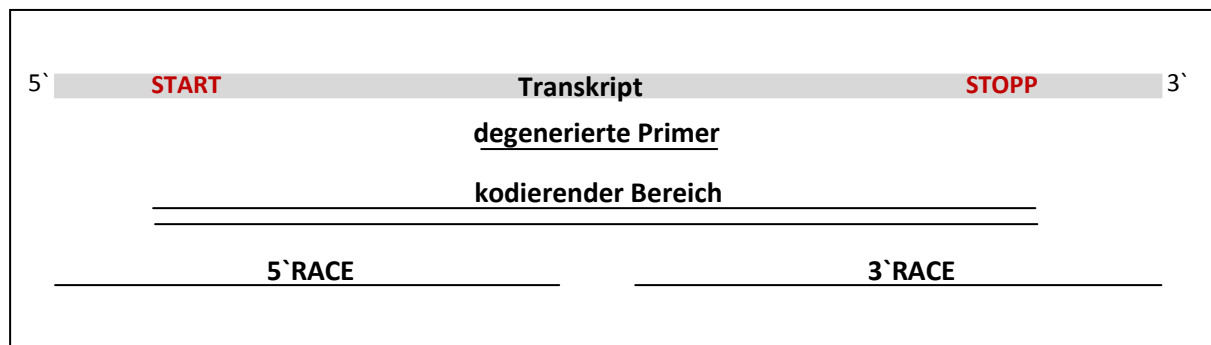


Abb. 3.1: Übersicht über die amplifizierten und sequenzierten Bereiche der Transkripte der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4* bzw. *CmGA2ox3*

Das Transkript der *CmGA20ox4* weist eine Gesamtlänge von 1430 bp auf, mit einem offenen Leserahmen von 1161 bp, der bei Position 79 mit dem Startcodon ATG/AUG beginnt und bei 1239 mit dem Stoppcodon TAA/UAA endet. Der kodierende Bereich umfasst damit 387 Aminosäuren und weist die höchste Identität zu Gibberellin 20-Oxidasen aus der Familie der *Cucurbitaceae* auf. So ist die *CmGA20ox4* zu 78% zu *WGA20OX1* aus *Citrullus lanatus* und zu 75% bzw. 72% zu der Gibberellin 20-Oxidase aus *Marah macrocarpus* bzw. *Cucumis sativus* identisch (Tab. 3.1). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens der *CmGA20ox4* mit den bekannten Gibberellin 20-Oxidasen aus *Cucurbita maxima* zeigt eine Identität zwischen 55% (*CmGA20ox3*) und 63% (*CmGA20ox1*).

Tab. 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenz des kodierenden Bereichs der Gibberellin 20-Oxidase-4 mit bekannten Gibberellin 20-Oxidasen aus *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*, *Citrullus lanatus* und *Marah macrocarpus*; die Sequenz der Gibberellin 20-Oxidase aus *Cucumis sativus* ist unter der angegebenen Gene ID in der Cucumber Genome Database und die anderen Sequenzen sind unter der angegebenen Accession Nr. in der GenBank erhältlich

Organismus	Beschreibung	Identität zu <i>CmGA20ox4</i>	Accession Nr. / Gene ID
<i>Cucurbita maxima</i>	<i>CmGA20ox1</i>	63%	X73314
	<i>CmGA20ox2</i>	62%	U61385
	<i>CmGA20ox3</i>	55%	AJ308480
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>WGA20OX1</i>	78%	AF074709
<i>Cucumis sativus</i>	Gibberellin 20-Oxidase	72%	Csa021105
<i>Marah macrocarpus</i>	Gibberellin 20-Oxidase	75%	Y09112

Für das *CmGA3ox4*-Transkript konnte eine Größe von 1283 bp ermittelt werden, wobei der kodierende Bereich, der bei Position 49 mit dem Startcodon ATG/AUG anfängt und bei Position 1101 mit dem Stoppcodon TAA/UAA endet, 1053 bp und damit 351 Aminosäuren beträgt. Wie bei der *CmGA2ox4* ist der kodierende Bereich der *CmGA3ox4* zu Mitgliedern der Familie *Cucurbitaceae* am identischsten. Dabei beträgt die Identität zu der Gibberellin 3-Oxidase-3 aus *Marah macrocarpus* 80% und zu einer Gibberellin 3-Oxidase aus *Cucumis sativus* 81% (Tab. 3.2). Zu den Gibberellin 3-Oxidasen aus *Cucurbita maxima* besteht dagegen eine nicht so hohe Identität von 35% bis 43%.

Tab. 3.2: Vergleich der Aminosäuresequenz des kodierenden Bereichs der Gibberellin 3-Oxidase-4 mit bekannten Gibberellin 3-Oxidasen aus *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus* und *Marah macrocarpus*; die Sequenz der Gibberellin 3-Oxidase aus *Cucumis sativus* ist unter der angegebenen Gene ID in der Cucumber Genome Database und die anderen Sequenzen sind unter der angegebenen Accesion Nr. in der GenBank erhältlich

Organismus	Beschreibung	Identität zu <i>CmGA3ox4</i>	Accesion Nr. / Gene ID
<i>Cucurbita maxima</i>	<i>CmGA3ox1</i>	35%	U63650
	<i>CmGA3ox2</i>	38%	AJ006453
	<i>CmGA3ox3</i>	43%	AJ302040
<i>Cucumis sativus</i>	Gibberellin 3-Oxidase	81%	Csa005826
<i>Marah macrocarpus</i>	Gibberellin 3-Oxidase-3	80%	HQ026485

Das klonierte cDNA-Fragment der *CmGA2ox2* umfasst lediglich den offenen Leserahmen, der 996 bp groß ist und für 332 Aminosäuren kodiert. Der offene Leserahmen des *CmGA2ox3*-Transkripts, der zwischen dem Startcodon ATG/AUG an der Position 67 und dem Stoppcodon TGA/UGA an der Position 1077 liegt, ist mit 1011 bp und 337 Aminosäuren geringfügig größer. Die Gesamtlänge beträgt dabei 1154 bp.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz des kodierenden Bereichs zeigt, dass die *CmGA2ox2* und die *CmGA2ox3* zu 43% identisch sind (Tab. 3.3). Zu der *CmGA2ox1* weisen beide eine höhere Identität von 48% für die *CmGA2ox2* bzw. 60% für die *CmGA2ox3* auf. Die höchste Identität besteht zu Gibberellin 2-Oxidasen aus *Cucumis sativus*, wobei die *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* zu einer jeweils anderen Gibberellin 2-Oxidase identischer sind. Neben den Gibberellin 2-Oxidasen aus der Familie der *Cucurbitaceae* besitzt besonders die *CmGA2ox3* hohe Identitäten zu Gibberellin 2-Oxidasen aus *Jatropha curcas* und *Ricinus communis*.

Tab. 3.3: Vergleich der Aminosäuresequenz des kodierenden Bereichs der Gibberellin 2-Oxidase-2 und Gibberellin 2-Oxidase-3 mit bekannten Gibberellin 2-Oxidasen aus *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*, *Jatropha curcas* und *Ricinus communis*; die Sequenzen der Gibberellin 2-Oxidasen aus *Cucumis sativus* sind unter der angegebenen Gene ID in der Cucumber Genome Database und die anderen Sequenzen sind unter der angegebenen Accession Nr. in der GenBank erhältlich

Organismus	Beschreibung	Identität zu <i>CmGA2ox2</i>	Identität zu <i>CmGA2ox3</i>	Accession Nr. / Gene ID
<i>C. maxima</i>	<i>CmGA2ox1</i>	48%	60%	AJ302041
	<i>CmGA2ox2</i>	/	43%	FN808420
	<i>CmGA2ox3</i>	43%	/	FN808421
<i>C. sativus</i>	Gibberellin 2-Oxidase	81%	62%	Csa000716
	Gibberellin 2-Oxidase	60%	89%	Csa022173
<i>J. curcas</i>	Gibberellin 2-Oxidase	62%	66%	GQ337078
<i>R. communis</i>	Gibberellin 2-Oxidase	55%	69%	XM_002519639

3.2 Charakterisierung der Gibberellin-Dioxygenasen

Zur Charakterisierung der neu identifizierten CmGA20ox4, CmGA3ox4, CmGA2ox2 und CmGA2ox3 wurden die rekombinanten Proteine der Gibberellin-Dioxygenasen mit radioaktiv markierten Gibberellinen inkubiert (Kap. 2.12.3), die Produkte mittels HPLC detektiert und mittels GC-MS identifiziert (Kap. 2.12.5). Die Massenspektren der identifizierten Gibberelline sind im Anhang (Kap. 6.4) dargestellt.

3.2.1 Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Gibberellin 20-Oxidase-4

Die Inkubation der rekombinanten CmGA20ox4 mit dem radioaktiv markierten GA₁₂ führte zur Bildung von Produkten, die als 3 Peaks in der HPLC mit dem online Radioaktivitätsdetektor mit Feststoffsintillator detektiert wurden (Abb. 3.2). Für die im Peak 1 und 2 aufgefundenen Stoffe konnten die spezifischen Massenspektren des GA₁₅, GA₂₄ und GA₉ mittels GC-MS nachgewiesen werden. Eine Analyse des Peaks 3 konnte auf Grund des zu geringen Signals nicht vorgenommen werden, könnte aber nach der in der HPLC ermittelten Retentionszeit das Substrat GA₁₂ enthalten.

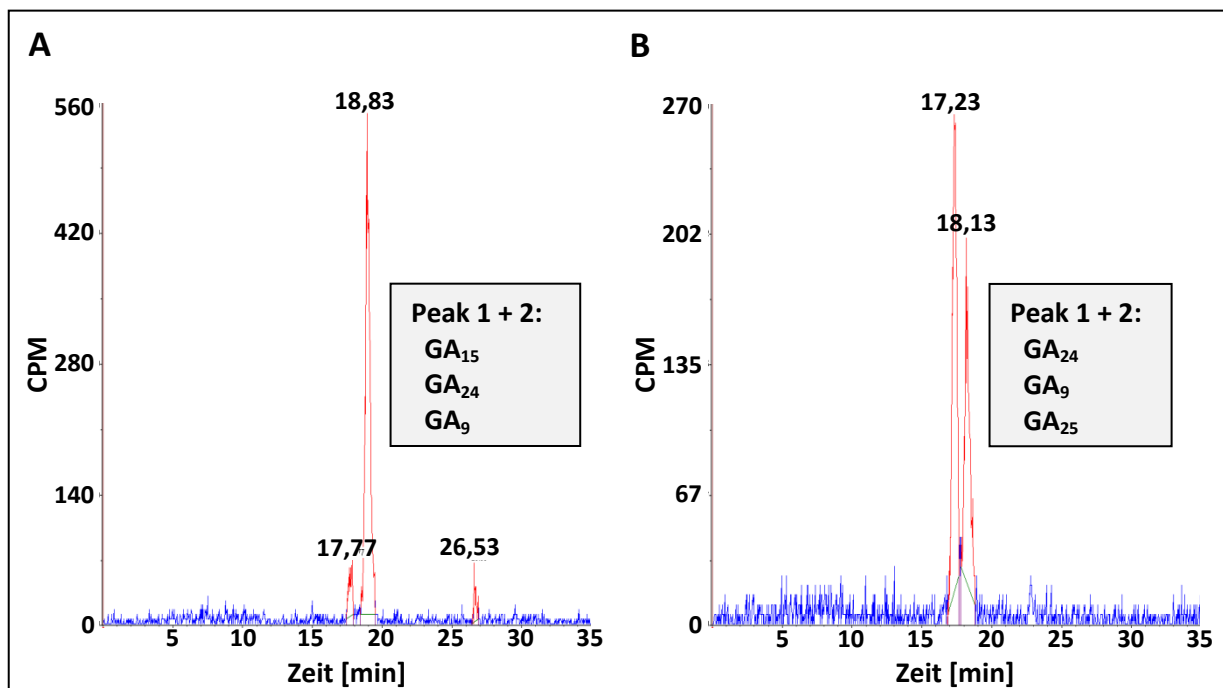


Abb. 3.2: Produkte nach erfolgter Inkubation der rekombinanten CmGA20ox4 mit [¹⁴C]GA₁₂ (A) bzw. mit [¹⁴C]GA₂₄ (B); dargestellt sind die mit dem online Radioaktivitätsdetektor mit Feststoffsintillator detektierten Peaks des HPLC-Laufs sowie die in den aufgefangenen Peaks mittels GC-MS identifizierte Gibberelline

Bei Erhöhung der Substratmenge durch Inkubation des rekombinanten Proteins mit [¹⁴C]GA₂₄ wurde neben der Synthese des GA₉ als Hauptprodukt auch die geringfügige Bildung von GA₂₅ nachgewiesen (Abb. 3.2). Damit konnte mit der CmGA20ox4 folgender Biosyntheseweg ausgehend von GA₁₂ ermittelt werden (Abb. 3.3).



Abb. 3.3: Mit der rekombinanten CmGA20ox4 ermittelter Biosyntheseweg bei Verwendung von GA₁₂ bzw. GA₂₄ als Substrat

3.2.2 Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Gibberellin 3-Oxidase-4

Bei Inkubation der rekombinanten CmGA3ox4 mit dem radioaktiv markierten GA₉ wurde ausschließlich 1 Produkt gebildet, welches in der GC-MS als GA₄ identifiziert wurde (Abb. 3.4). Dabei wurde das komplette GA₉ umgesetzt, so dass das Substrat in dem Inkubationsansatz nicht mehr nachweisbar war.

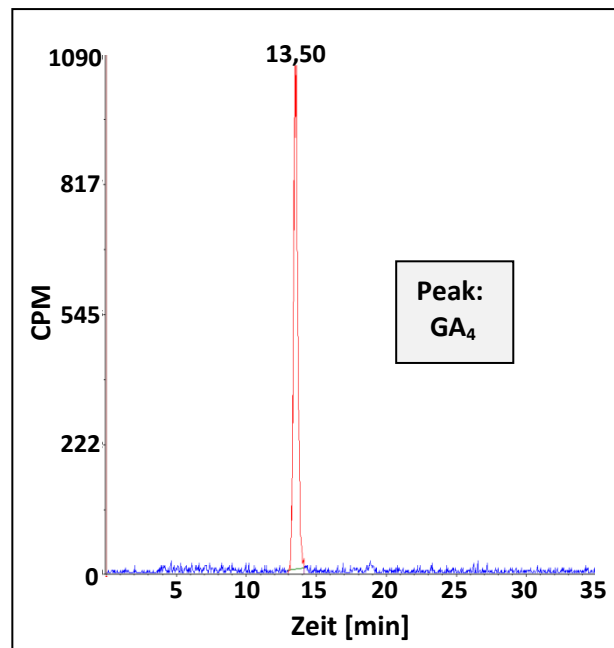


Abb. 3.4: Produkt nach erfolgter Inkubation der rekombinanten CmGA3ox4 mit $[^{14}\text{C}]\text{GA}_9$, dargestellt ist das mit dem online Radioaktivitätsdetektor mit Feststoffsintillator detektierte Peak des HPLC-Laufs sowie das in dem aufgefangenen Peak mittels GC-MS identifizierte Gibberellin

Mit der CmGA3ox4 konnte somit folgender Biosyntheseweg ausgehend von GA_9 ermittelt werden (Abb. 3.5).



Abb. 3.5: Mit der rekombinanten CmGA3ox4 ermittelter Biosyntheseweg bei Verwendung von GA_9 als Substrat

3.2.3 Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Gibberellin 2-Oxidase-2 und der Gibberellin 2-Oxidase-3

In der HPLC konnten 3 Peaks nach erfolgter Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit dem radioaktiv markierten GA_4 detektiert werden (Abb. 3.6). Als Produkte konnten dabei GA_{34} , GA_{34} -Katabolit (als Keton) und mehrere neue, bisher unbekannte Gibberellin-Katabolite nachgewiesen werden.

Zur Verifizierung, dass die unbekannten Stoffe Katabolite des GA_{34} sind, wurde das rekombinante Enzym mit radioaktiv markierten GA_{34} inkubiert. Eine Identifizierung der

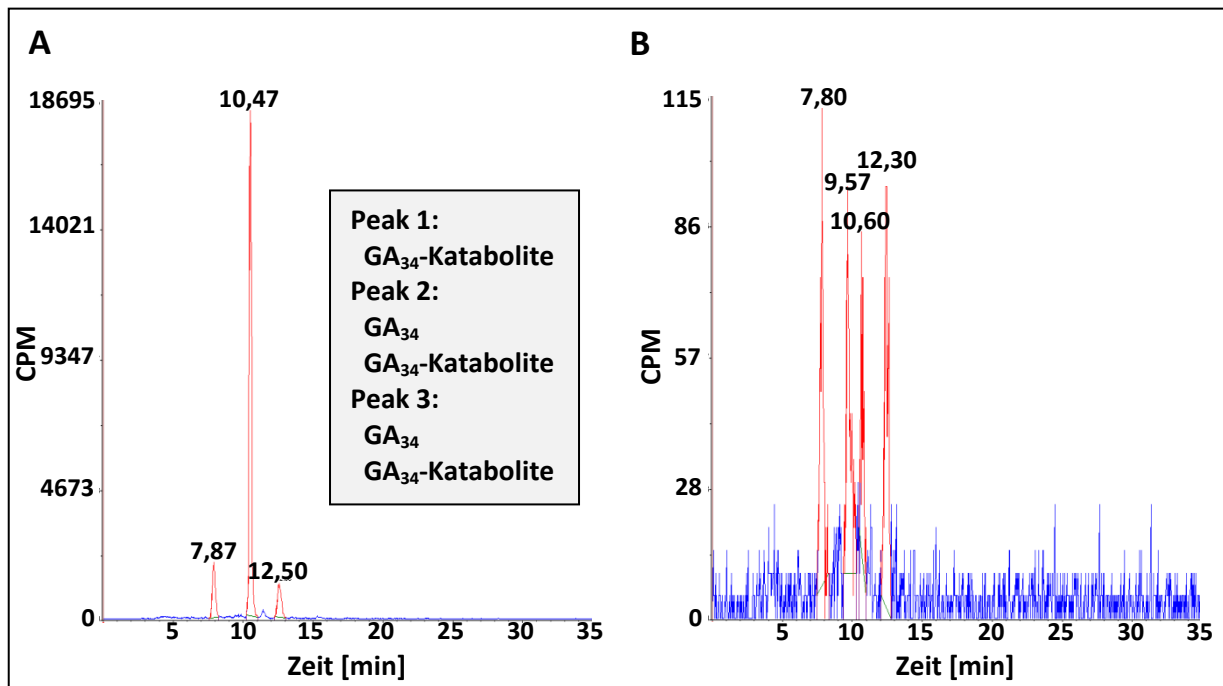


Abb. 3.6: Produkte nach erfolgter Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit $[^{14}C]$ GA_4 (A) bzw. mit $[^{14}C]$ GA_{34} (B); dargestellt sind die mit dem online Radioaktivitätsdetektor mit Feststoffsintillator detektierten Peaks des HPLC-Laufs sowie die in den aufgefangenen Peaks mittels GC-MS identifizierte Gibberelline

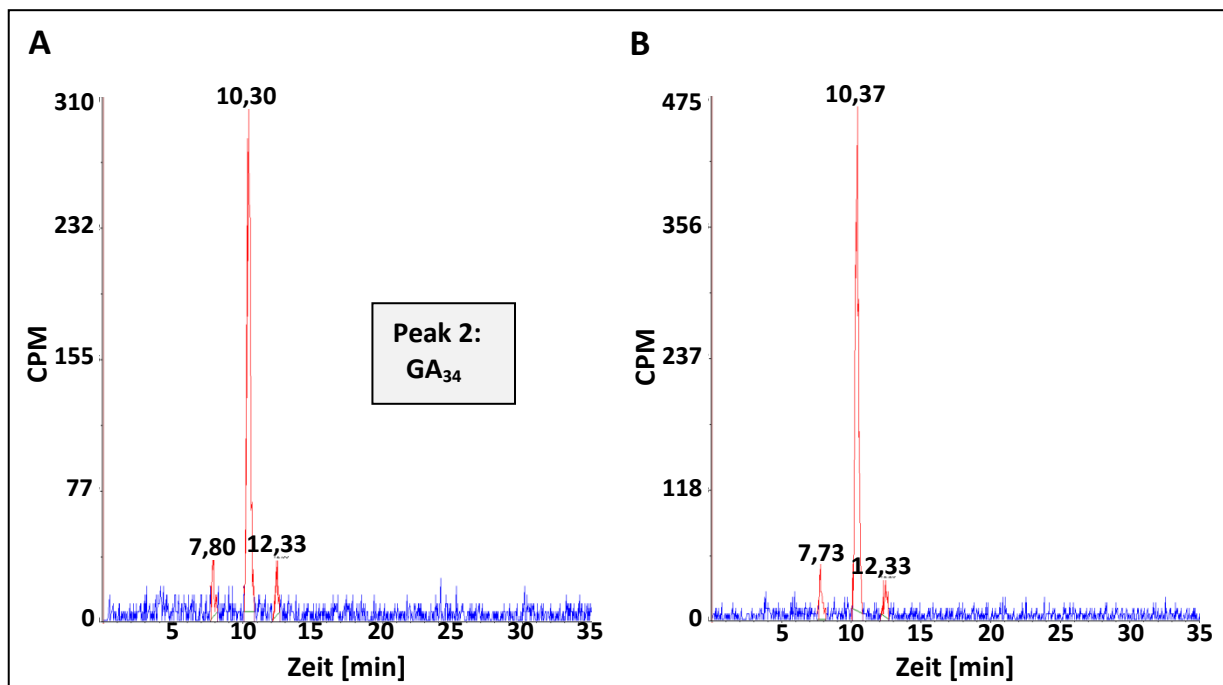


Abb. 3.7: Produkte nach erfolgter Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}C]$ GA_4 (A) bzw. mit $[^{14}C]$ GA_{34} (B); dargestellt sind die mit dem online Radioaktivitätsdetektor mit Feststoffsintillator detektierten Peaks des HPLC-Laufs sowie das in den aufgefangenen Peaks mittels GC-MS identifizierte Gibberellin

Produkte konnte auf Grund zu schwacher Signale nicht mittels GC-MS erfolgen. Jedoch besaßen die in der HPLC detektierten Produkte vergleichbare Retentionszeiten zu den Produkten des Inkubationsansatzes mit GA_4 (Abb. 3.6). Dabei wurde ein zusätzlicher Peak bei der Retentionszeit 9,57 min bestimmt, der auf die Synthese eines weiteren Produkts aus GA_{34} hindeutet. Bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}C]GA_4$ wurden in der HPLC 3 Peaks mit zu dem Inkubationsansatz der CmGA2ox2 vergleichbaren Retentionszeiten detektiert (Abb. 3.7). Lediglich für den Peak 2 konnte eine Analyse mit der GC-MS durchgeführt werden, wobei das Produkt GA_{34} identifiziert wurde. Bei Verwendung von radioaktiv markierten GA_{34} als Substrat wurden in der HPLC ebenfalls drei Peaks mit den wie bei Inkubation mit GA_4 ermittelten Retentionszeiten detektiert. Der bei Inkubation mit CmGA2ox2 beobachtete Peak bei 9,57 min fehlte dabei.

Die Kontrollansätze der CmGA2ox2 bzw. der CmGA2ox3 mit GA_{34} , bei denen das Protein durch Aufkochen denaturiert wurde, wiesen in der HPLC lediglich je einen Peak mit der spezifischen Retentionszeit für GA_{34} auf (Kap. 6.4).

Die Produkte wurden somit enzymatisch aus GA_{34} gebildet (Abb. 3.8) und entstanden nicht durch Zerfall während der Inkubation oder der durchgeführten Methoden.



Abb. 3.8: Mit der rekombinanten CmGA2ox2 bzw. CmGA2ox3 ermittelter Biosyntheseweg bei Verwendung von GA_4 bzw. GA_{34} als Substrat

Des Weiteren führte die Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit dem 13-hydroxylierten $[^{14}C]GA_1$ zur Synthese von GA_8 (Abb. 3.10). Ein weiterer Katabolismus konnte dabei im Gegensatz zur Verwendung von GA_4 nicht bestimmt werden.

Damit konnte mit der CmGA2ox3 folgender Biosyntheseweg ausgehend von GA_1 ermittelt werden (Abb. 3.9).



Abb. 3.9: Mit der rekombinanten CmGA2ox3 ermittelter Biosyntheseweg bei Verwendung von GA_1 als Substrat

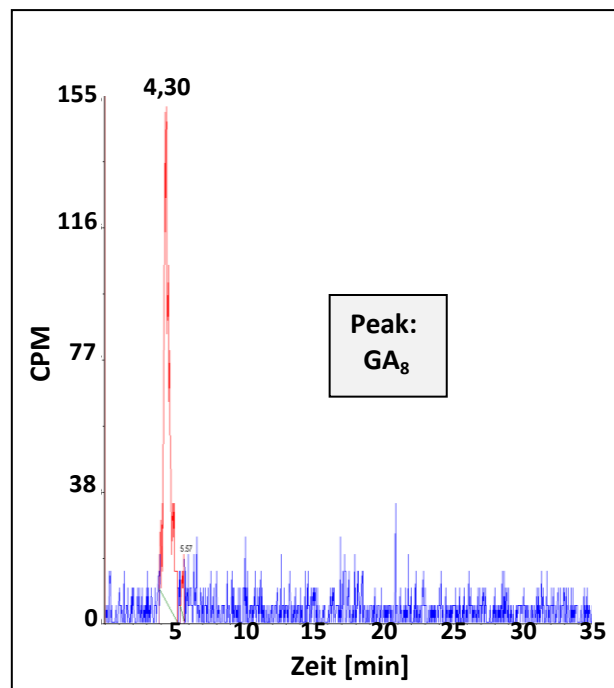


Abb. 3.10: Produkt nach erfolgter Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}\text{C}]\text{GA}_1$, dargestellt ist das mit dem on-line Radioaktivitätsdetektor mit Feststoffsintillator detektierte Peak des HPLC-Laufs sowie das in dem aufgefangenen Peak mittels GC-MS identifizierte Gibberellin

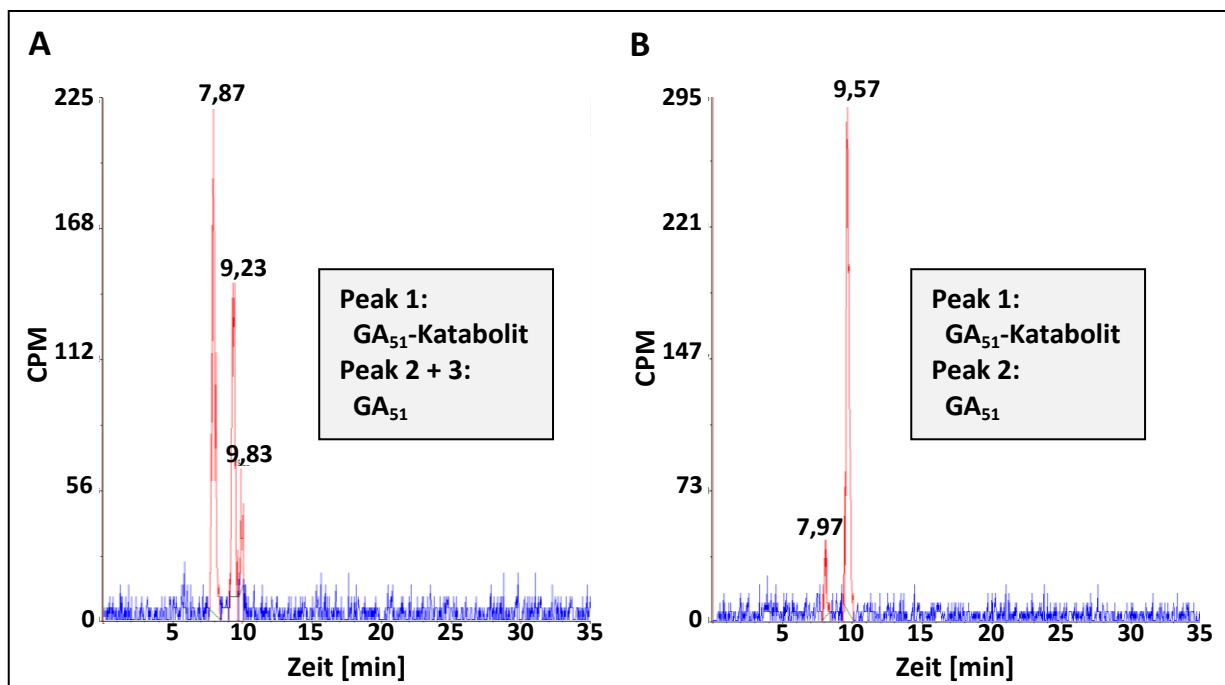


Abb. 3.11: Produkte nach erfolgter Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 (A, Inkubationszeit 10 min) bzw. der rekombinanten CmGA2ox3 (B, Inkubationszeit 16 h) mit $[^{14}\text{C}]\text{GA}_9$, dargestellt sind die mit dem online Radioaktivitätsdetektor mit Feststoffsintillator detektierten Peaks des HPLC-Laufs sowie das in den aufgefangenen Peaks mittels GC-MS identifizierte Gibberellin

Bei Inkubationen der rekombinanten CmGA2ox2 bzw. CmGA2ox3 mit [¹⁴C]GA₉ konnten mittels GC-MS die Synthese von GA₅₁ und GA₅₁-Katabolit (als Enol) nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Dabei musste auf Grund der hohen Aktivität der CmGA2ox2 die Inkubationszeit auf 10 Minuten verkürzt werden, da bei längeren Inkubationen lediglich das GA₅₁-Katabolit jedoch nicht die Vorstufe GA₅₁ detektiert werden konnte (nicht dargestellt). Somit konnte neben der 2β-Hydroxylierung von 3β-hydroxylierten Gibberellinen auch ein Katabolismus der Vorstufe des bioaktiven Hormons durch die untersuchten Gibberellin 2-Oxidasen nachgewiesen werden (Abb. 3.12).

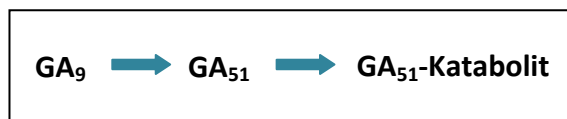


Abb. 3.12: Mit der rekombinanten CmGA2ox2 bzw. CmGA2ox3 ermittelter Biosyntheseweg bei Verwendung von GA₉ als Substrat

3.3 Quantifizierung der Transkriptgehalte der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene

3.3.1 Quantifizierung der Transkriptgehalte der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene in Kürbiskeimlingen

Das Hypokotyl und die Wurzelspitze stellen wichtige Orte der Gibberellin-Biosynthese während der Entwicklung von Kürbiskeimlingen (*Cucurbita maxima* L.) dar (Lange et al., 2005). Dabei konnte eine zu den endogenen Gibberellinen korrelierende Expression in Kürbis bekannter Gibberellin 20-Oxidasen bzw. Gibberellin 3-Oxidasen lediglich im Hypokotyl nachgewiesen werden. Die Identifizierung neuer Gibberellin-Dioxygenasen in der Wurzelspitze 7 Tage alter Keimlinge (Kap. 3.1), lässt eine Funktion dieser Enzyme bei der Synthese des bioaktiven Hormons in der Wurzel während der Keimlingsentwicklung vermuten. Daher wurde zur Aufklärung der Gibberellin-Biosynthese das Expressionsmuster der im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten CmGA20ox4, CmGA3ox4, CmGA2ox2 und CmGA2ox3 sowie der im Samen expremierten CmGA3ox1 und CmGA3ox2 ermittelt. Zusätzlich wurden die an der Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion

beteiligten Gene, die bisher in Kürbiskeimlingen noch nicht untersucht wurden, analysiert, um den Ort der Gibberellin-Wirkung zu lokalisieren.

Dazu wurden die Transkriptgehalte der Gene der Gibberellin-Signalwege mittels kompetitiver RT-PCR in den Organen 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alter Keimlinge quantifiziert (Kap. 2.10). Die Keimlinge wurden unterteilt in Sprossspitze, Kotyledone, Hypokotyl, Wurzelrest und Wurzelspitze, wobei für das jüngste Entwicklungsstadium die Sprossspitze auf Grund der geringfügigen Ausbildung nicht separat untersucht wurde (Kap. 2.1.2). Die Quantifizierung erfolgte für zwei unabhängige Pflanzenanzuchten, wobei Im Folgenden lediglich die Ergebnisse einer Anzucht dargestellt sind. Die Ergebnisse der zweiten Anzucht bestätigen das ermittelte Expressionsmuster und sind im Anhang (Kap. 6.5) zusammen mit den zur Quantifizierung der Transkriptgehalte verwendeten Gelbildern beider Pflanzenanzuchten abgebildet.

Gibberellin-Biosynthese

Die Expression der *CmGA20ox4* beschränkt sich in 3 Tage alten Kürbiskeimlingen auf die Wurzelorgane und das Hypanthium, wobei der höchste Transkriptgehalt in der Wurzelspitze mit 0,23 µg/g Gesamt-RNA ermittelt wurde (Abb. 3.13A).

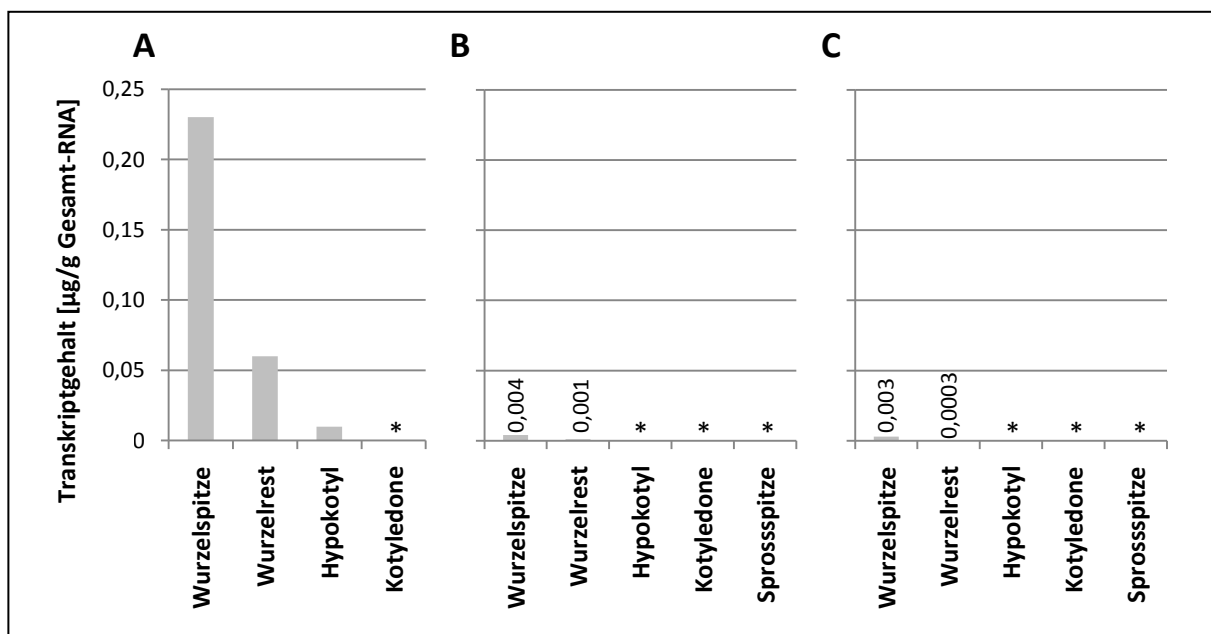


Abb. 3.13: Transkriptgehalte der *CmGA20ox4* in den Keimlingsorganen der 3 Tage (A), 5 Tage (B) und 7 Tage (C) alten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.);* Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,0001 µg/g Gesamt-RNA

Während der weiteren Keimlingsentwicklung sinken die Gehalte, so dass in 5 Tage und 7 Tage alten Keimlingen in der Wurzelspitze bzw. dem Wurzelrest lediglich eine geringe und

im Hypokotyl keine Expression nachweisbar war (Abb. 3.13B, C). Für die Kotyledone und die Sprossspitze konnten dabei in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien Transkripte nachgewiesen werden. Auch für die *CmGA3ox4* konnten in der Kotyledone, in der Sprossspitze und zusätzlich im Hypokotyl der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Keimlinge keine Transkripte detektiert werden (Abb. 3.14). Die Expression beschränkt sich damit auf den unterirdischen Keimlingsabschnitt, wobei höhere Gehalte im Wurzelrest als in der Wurzelspitze auftreten. Im Gegensatz zu dem Expressionsmuster der *CmGA20ox4* steigen die Transkriptgehalte während der Keimlingsentwicklung an, so dass in 3 Tage alten Keimlingen Gehalte von 0,0002 µg/g Gesamt-RNA bzw. 0,0002 µg/g Gesamt-RNA und in 7 Tage alten Keimlingen Gehalte von 0,11 µg/g Gesamt-RNA bzw. 0,01 µg/g Gesamt-RNA in den Wurzelorganen bestimmt wurden.

Zusätzlich zu der neu identifizierten *CmGA3ox4* wurden die Transkriptgehalte der im Samen expremierten *CmGA3ox1* und *CmGA3ox2* in den Keimlingsorganen quantifiziert. Dabei konnte keine oder lediglich eine an der Nachweisgrenze von 0,0001 µg/g Gesamt-RNA (*CmGA3ox1*) bzw. 0,001 µg/g Gesamt-RNA (*CmGA3ox2*) liegende Expression in den Organen während der Keimlingsentwicklung nachgewiesen werden (Kap. 6.5).

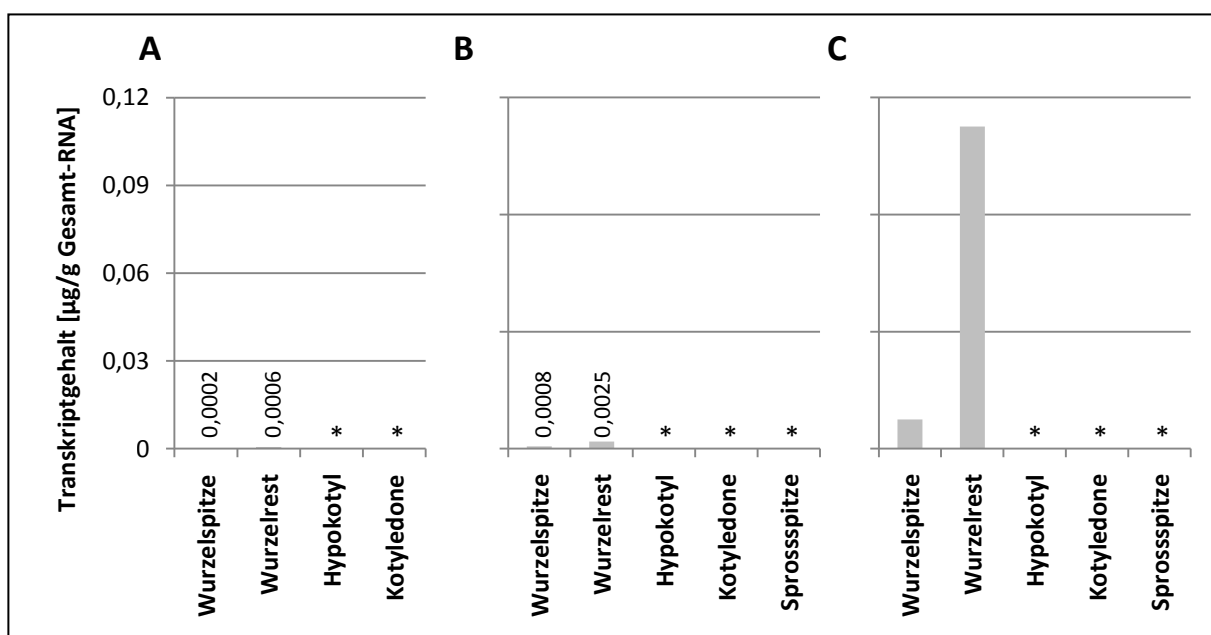


Abb. 3.14: Transkriptgehalte der *CmGA3ox4* in den Keimlingsorganen der 3 Tage (A), 5 Tage (B) und 7 Tage (C) alten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.); * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,00001 µg/g Gesamt-RNA

Transkripte der *CmGA2ox2* konnten in den untersuchten Keimlingsorganen nachgewiesen werden, jedoch waren die auf den Gelbildern sichtbaren Banden für eine exakte Bestimmung des Transkriptgehalts in der Sprossspitze, der Kotyledone, dem Hypokotyl und der

Wurzelspitze zu schwach (Transkriptgehalte unter 0,002 µg/g Gesamt-RNA). Im Wurzelrest liegen höhere Transkriptgehalte vor, wobei die Expression während der Keimlingsentwicklung ansteigt (Abb. 3.15).

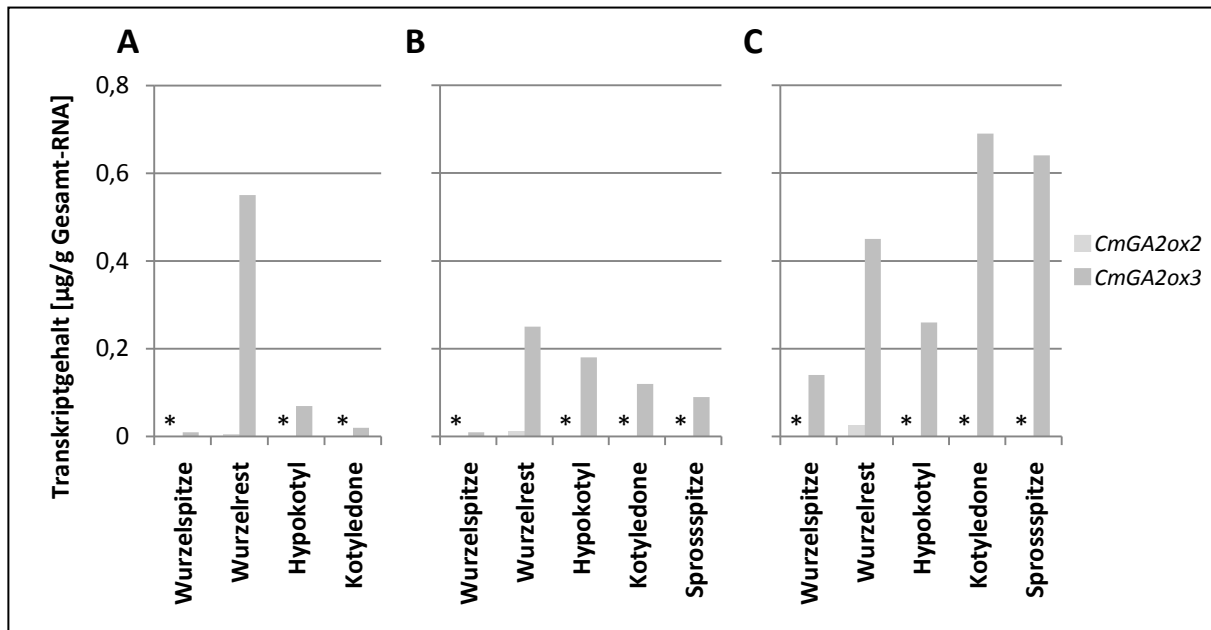


Abb. 3.15: Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* und der *CmGA2ox3* in den Keimlingsorganen der 3 Tage (A), 5 Tage (B) und 7 Tage (C) alten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.); * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,002 µg/g Gesamt-RNA

Die *CmGA2ox3* ist während der Keimlingsentwicklung stärker expremiert als die *CmGA2ox2* (Abb. 3.15). In 3 Tage alten Keimlingen besitzt der Wurzelrest mit 0,55 µg/g Gesamt-RNA einen höheren Transkriptgehalt als die anderen Gewebe mit Gehalten im Bereich von 0,01 – 0,07 µg/g Gesamt-RNA (Abb. 3.15A). Der Transkriptgehalt bleibt im Wurzelrest während der Keimlingsentwicklung relativ konstant, wogegen die Gehalte in den anderen Organen, besonders in der Sprossspitze und der Kotyledone, ansteigen (Abb. 3.15B, C). So wurde in der Sprossspitze, der Kotyledone und dem Wurzelrest 7 Tage alter Keimlinge eine höhere Expression als im Hypokotyl oder in der Wurzelspitze nachgewiesen.

In den drei untersuchten Entwicklungsstadien der Kürbiskeimlinge konnte somit eine Expression der neu identifizierten *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* nachgewiesen werden, wogegen die *CmGA3ox1* und die *CmGA3ox2* nicht oder lediglich schwach transkribiert sind.

Die *CmGA20ox4* ist in den Wurzelorganen stärker als in den Sprossorganen expremiert, wobei die Gehalte während der Entwicklung abnehmen. Für die *CmGA3ox4*, die eine Beschränkung auf die Wurzelorgane besitzt, steigt dagegen die Expression während der Entwicklung an, so dass vor 7 Tage alten Keimlinge lediglich geringe Transkriptgehalte

ermittelt werden konnten. Vergleichbar besitzt die *CmGA2ox3* in den Organen 7 Tage alter Keimlinge, mit Ausnahme des Wurzelrestes, höhere Gehalte als in den Entwicklungsstadien davor. Im Wurzelrest, der ebenfalls die höchsten Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* besitzt, ist die *CmGA2ox3* relativ konstant und stark während der gesamten Entwicklung transkribiert.

Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion

Das Gibberellin-Rezeptor-Gen *CmGID1a* ist während der Keimlingsentwicklung relativ konstant expremiert, wobei geringfügig höhere Transkriptgehalte in der Kotyledone, dem Hypokotyl und dem Wurzelrest als in der Sprossspitze oder der Wurzelspitze ermittelt wurden (Abb. 3.16). Dagegen wurden für *CmGID1b* im Wurzelrest höhere Transkriptgehalte als in den anderen Organen 3 Tage und 5 Tage alter Keimlinge quantifiziert (Abb. 3.16A, B). Die Expression für die jeweiligen Gewebe dieser Entwicklungsstadien ist dabei relativ konstant, wogegen die Transkriptgehalte während der weiteren Entwicklung ansteigen. So besitzen die Organe 7 Tage alter Keimlinge die höchsten Transkriptgehalte, wobei im Gegensatz zu dem Expressionsmuster der *CmGID1a* die *CmGID1b* in der Sprossspitze, dem Wurzelrest und der Wurzelspitze stärker expremiert ist als in der Kotyledone oder dem Hypokotyl (Abb. 3.16C).

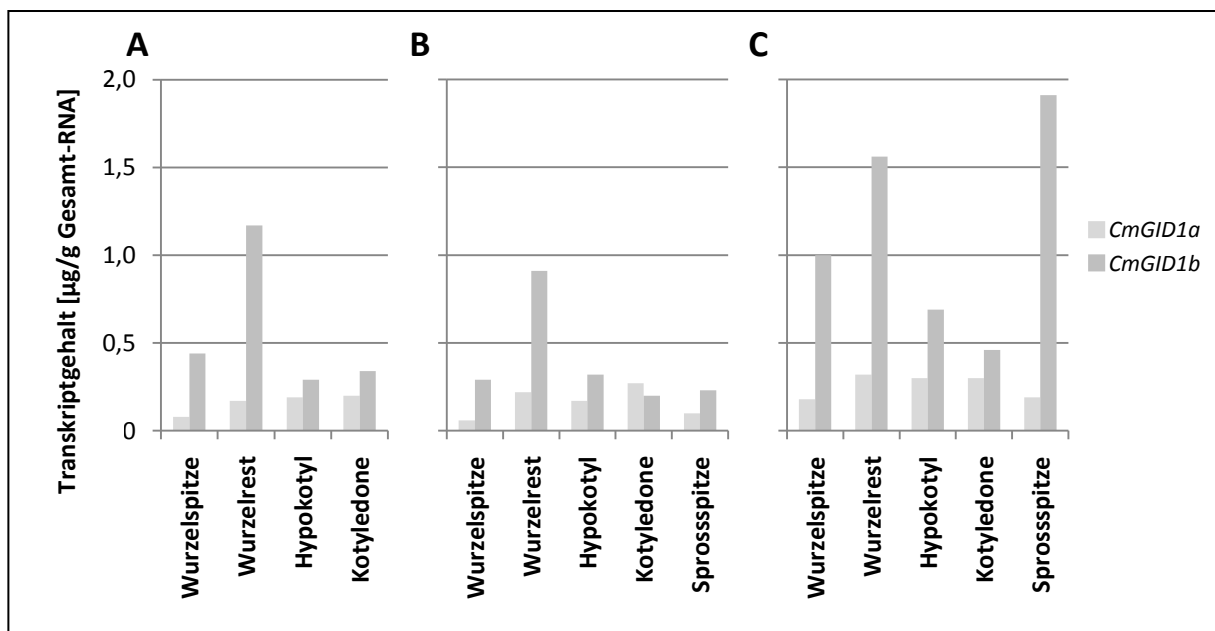


Abb. 3.16: Transkriptgehalte der *CmGID1a* und der *CmGID1b* in den Keimlingsorganen der 3 Tage (A), 5 Tage (B) und 7 Tage (C) alten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.)

Transkripte der *CmGAIPa* kommen in 3 und 5 Tage alten Keimlingen vorwiegend in der Kotyledone und dem Hypokotyl vor (Abb. 3.17A, B), wobei geringere Transkriptgehalte in 5 Tage alten Keimlingen ermittelt wurden. Die Expression in der Kotyledone bleibt in der weiteren Entwicklung relativ konstant, wogegen in den anderen Organen eine Erhöhung zu verzeichnen ist. Somit wurden in 7 Tage alten Keimlingen höhere Gehalte an *CmGAIPa*-mRNA im Hypokotyl, im Wurzelrest und in der Wurzelspitze detektiert (Abb. 3.17C). In den anderen Pflanzenanzuchten wurde entsprechend eine Erhöhung in diesen Geweben beobachtet, jedoch sind die Unterschiede der Transkriptgehalte zwischen den Organen schwächer ausgeprägt (Kap. 6.5).

Im Hypokotyl 3 Tage und 5 Tage alter Keimlinge wurden höhere Transkriptgehalte der *CmGAIPb* ermittelt als in den anderen Organen (Abb. 3.17A, B). Dabei ist wie für *CmGAIPa* eine Reduktion der *CmGAIPb*-mRNA zwischen diesen Entwicklungsstadien sichtbar. Die Expression in der Kotyledone, dem Hypokotyl und der Wurzelspitze der 7 Tage alten Keimlinge (Abb. 3.17C) entsprechen relativ den der 5 Tage alten Keimlinge. Dagegen wurde eine Erhöhung in der Sprossspitze und dem Wurzelrest bestimmt. Im Gegensatz zu der *CmGAIPa* weist die *CmGAIPb* stärker ausgeprägte Unterschiede in der Expression 7 Tage alter Keimlingsorgane auf. So wurden höhere Transkriptgehalte in der Sprossspitze, dem Hypokotyl und dem Wurzelrest als in den anderen Organen ermittelt.

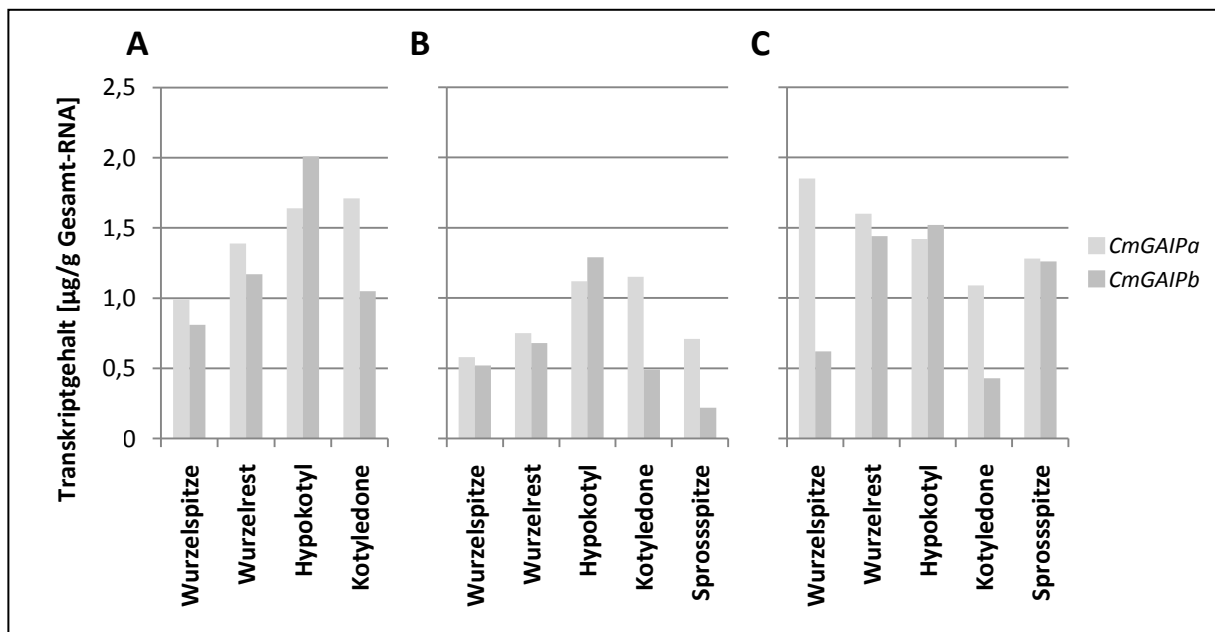


Abb. 3.17: Transkriptgehalte der *CmGAIPa* und der *CmGAIPb* in den Keimlingsorganen der 3 Tage (A), 5 Tage (B) und 7 Tage (C) alten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.)

Neben den Gibberellin-Dioxygenase-Genen konnte somit eine Expression der bisher bekannten Gibberellin-Perzeptions-Gene und Gibberellin-Signaltransduktions-Gene während der Entwicklung von Kürbiskeimlingen (*Cucurbita maxima* L.) nachgewiesen werden.

Das Gibberellin-Rezeptor-Gen *CmGID1a* ist in den Organen und während der Entwicklung relativ konstant expremiert. *CmGID1b* besitzt dagegen eine organ- und entwicklungs-spezifische Transkription, wobei im Wurzelrest während der gesamten Keimlingsentwicklung und in der Wurzelspitze sowie Sprossspitze in 7 Tage alten Keimlingen hohe Transkript-gehalte vorliegen.

Die an der Gibberellin-Signaltransduktion beteiligten Gene, *CmGAIPa* und *CmGAIPb*, zeigen in 3 Tage alten Keimlingen ein vergleichbares Expressionsmuster. Dagegen ist bei 5 Tage alten Keimlingen *CmGAIPa* in der Kotyledone und der Sprossspitze sowie in 7 Tage alten Keimlinge in der Kotyledone und der Wurzelspitze stärker als *CmGAIPb* expremiert.

3.3.2 Einfluss von Gibberellin auf die Expression der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene in Kürbiskeimlingen

In vielen Pflanzen, so auch in der in dieser Arbeit untersuchten Kürbisart, ist die Transkription vieler Mitglieder der Multigenfamilien der Gibberellin-Signalwege von dem endogenen Gehalt an bioaktiven Gibberellin abhängig. Daher wurde eine mögliche 'Feedback'- bzw. 'Feedforward'-Regulation der neu identifizierten Gibberellin-Dioxygenase-Gene in 7 Tage alten Keimlingen untersucht und somit auch eine Beteiligung an der Gibberellin-Homöostase ermittelt. Zusätzlich wurde der regulatorische Einfluss auf die Transkription der für die Gibberellin-Rezeptoren und der für die Repressoren der Gibberellin-Wirkung kodierenden Gene analysiert.

Dazu wurden die Keimlinge von Beginn der Quellung der Samen bis zur Ernte mit einer 10^{-5} M LAB 150 978-Lösung, einem Inhibitor der Gibberellin-Biosynthese, bzw. mit einer 10^{-6} M GA₄-Lösung behandelt (Kap. 2.1.2). Die Quantifizierung der Transkriptgehalte (Kap. 2.10) in der Sprossspitze, der Kotyledone, dem Hypokotyl, dem Wurzelrest und der Wurzelspitze erfolgte für zwei unabhängige Pflanzenanzuchten. Im Folgenden werden die Ergebnisse für eine der Anzuchten dargestellt. Die Ergebnisse der zweiten Anzucht, die die ermittelten Expressionsmuster bestätigen, sind im Anhang (Kap. 6.4) mit den Originaldaten abgebildet.

Gibberellin-Biosynthese

Die Expression der *CmGA20ox4* ist wie im Kap. 3.3.1 beschrieben in 7 Tage alten Keimlingen auf die Wurzel beschränkt (Abb. 3.18A). Dabei wurde im Wurzelrest und der Wurzelspitze der mit 10^{-5} M LAB 150 978 behandelten Keimlinge höhere Transkriptgehalte ermittelt als in den unbehandelten. So wurde in der Wurzelspitze der Kontrollanzucht ein Transkriptgehalt von 0,004 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA bestimmt, wogegen das entsprechende Organ

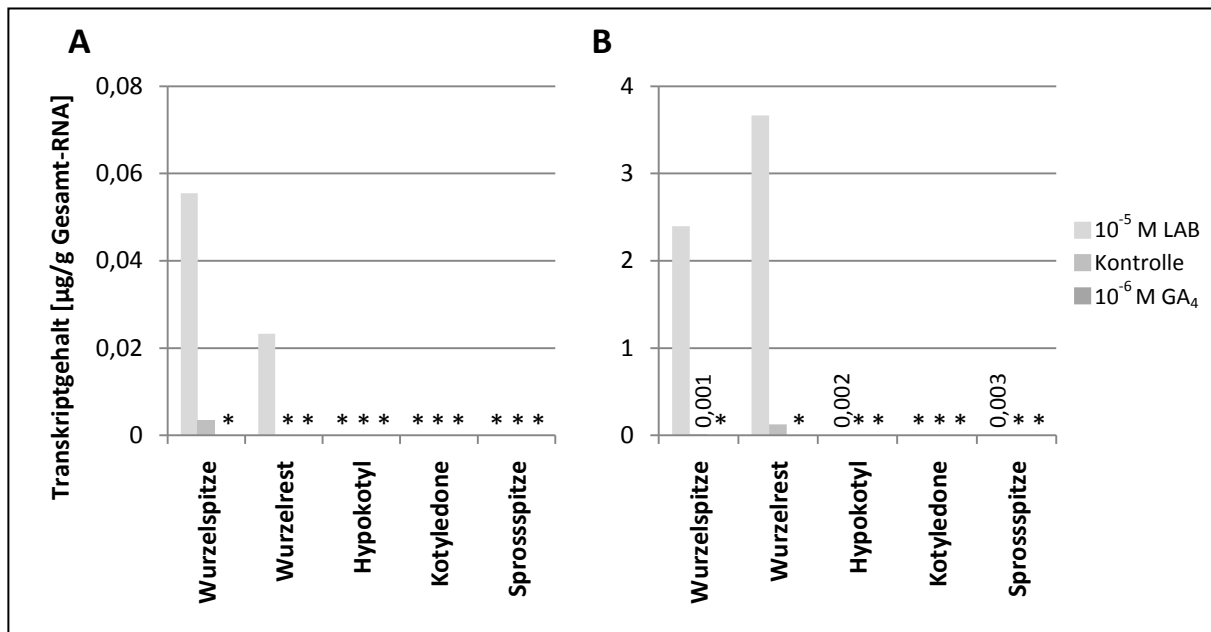


Abb. 3.18: Transkriptgehalte der *CmGA20ox4* (A) und der *CmGA3ox4* (B) in den Keimlingsorganen der 7 Tage alten mit Leitungswasser (0,1% Methanol), mit 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. mit 10^{-6} M GA₄ behandelten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.); * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,0001 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA

der LAB 150 978-Behandlung mit 0,056 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA einen mehr als 10-fach höheren Gehalt besitzt. In den Organen der mit 10^{-6} M GA₄ behandelten Keimlingen findet dagegen keine nachweisbare Expression des Gens statt.

Vergleichbar zur *CmGA20ox4* wurden Transkripte der *CmGA3ox4* in unbehandelten Keimlingen lediglich in der Wurzel und in den mit GA₄ behandelten Keimlingen in keinem der untersuchten Organe detektiert (Abb. 3.18B). Die Behandlung mit 10^{-5} M LAB 150 978 führt zu einer deutlichen Erhöhung der Expression in den Organen der Wurzel. Dabei zeigen der Wurzelrest und die Wurzelspitze eine vergleichbar starke Expression, wogegen in unbehandelten Keimlingen ein 12-fach höherer Transkriptgehalt im Wurzelrest als in der Wurzelspitze ermittelt wurde. Neben dem Anstieg des Gehalts in der Wurzel konnte im Gegensatz zu der *CmGA20ox4* eine geringe Expression in der Sprossspitze und dem Hypokotyl der mit LAB 150 978 behandelten Keimlinge verzeichnet werden.

Zusätzlich wurden die Transkriptgehalte der *CmGA3ox2* in der Wurzelspitze der Kontrollanzucht und der mit LAB 150 978 behandelten Keimlinge quantifiziert. Dabei konnte keine Veränderung der Transkription durch LAB 150 978-Behandlung beobachtet werden (Kap. 6.5).

Die Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* liegen in der Sprossspitze, der Kotyledone, dem Hypokotyl und der Wurzelspitze unter der Nachweisgrenze von 0,002 µg/g Gesamt-RNA, wobei die jeweiligen Organe der mit LAB 150 978 bzw. der mit GA₄ behandelten Keimlinge keine zu den unbehandelten Keimlingen unterschiedlich ausgeprägte Expression aufweisen.

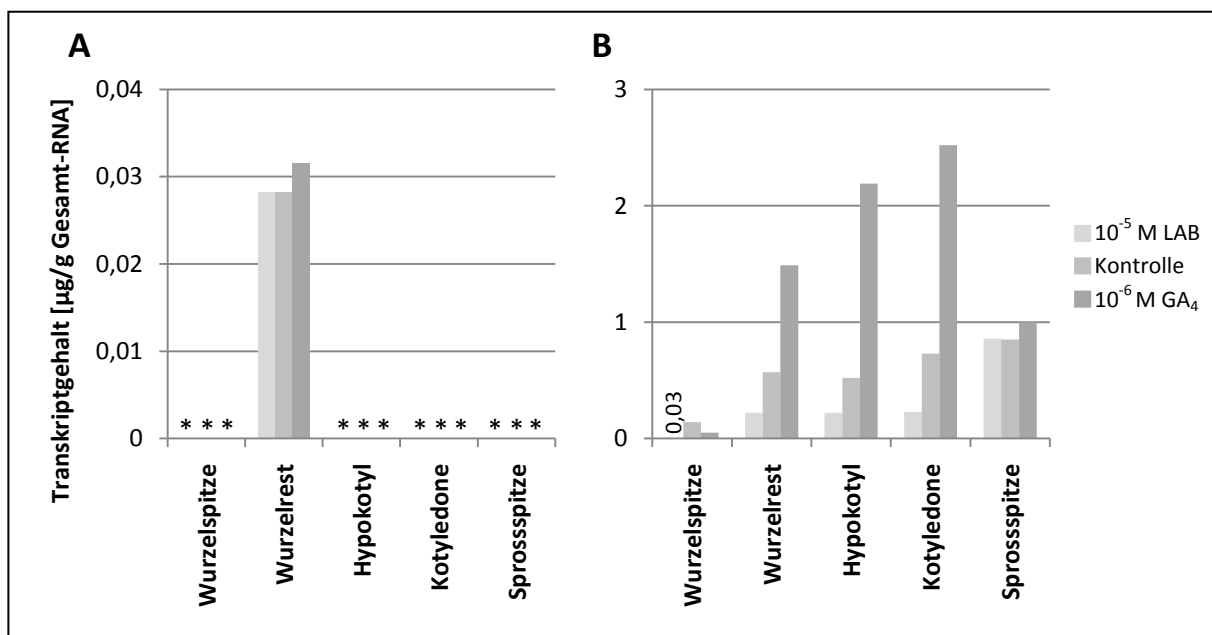


Abb. 3.19: Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* (A) und der *CmGA2ox3* (B) in den Keimlingsorganen der 7 Tage alten mit Leitungswasser (0,1% Methanol), mit 10⁻⁵M LAB 150 978 bzw. mit 10⁻⁶M GA₄ behandelten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.); * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,002 µg/g Gesamt-RNA

Auch für den Wurzelrest, der den höchsten Gehalt an *CmGA2ox2*-mRNA besitzt, wurden für alle drei Behandlungen ähnliche Transkriptgehalte von 0,028 – 0,032 µg/g Gesamt-RNA ermittelt (Abb. 3.19A).

Die Expression der *CmGA2ox3* dagegen weicht in den behandelten von den unbehandelten Keimlingen ab. So wurden in der Kotyledone, dem Hypokotyl und dem Wurzelrest im Vergleich zur Kontrolle geringere Transkriptgehalte in den mit LAB 150 978 behandelten und höhere Transkriptgehalte in den mit GA₄ behandelten Keimlingen bestimmt (Abb. 3.19B). Dagegen konnte in der Sprossspitze und der Wurzelspitze kein Unterschied zwischen den Behandlungen beobachtet werden.

Einen Einfluss des endogenen Gibberellin-Gehalts auf die Transkription konnte somit für die *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4* und *CmGA2ox3* nachgewiesen werden. Dabei weisen die an der Bildung bioaktiver Gibberelline beteiligten Gene eine Erhöhung und das an der Inaktivierung bioaktiver Gibberelline beteiligte Gen eine Verringerung der Transkription bei Senkung des endogenen Gibberellin-Gehalts auf. Eine Erhöhung des endogenen Gibberellin-Gehalts führt zu dem gegenteiligen Effekt.

Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion

In den untersuchten Organen 7 Tage alter Keimlinge konnte das in Kapitel 3.3.1 beschriebene Expressionsmuster der Gene der Gibberellin-Perzeption und Gibberellin-Signaltransduktion bestätigt werden. Dabei wurde eine von der Kontrolle abweichende Expression der *CmGID1b* in den behandelten Keimlingen beobachtet (Abb. 3.20B). In den untersuchten Organen der mit 10^{-5} M LAB 150 978 behandelten Keimlinge wurden höhere und in den Organen der mit 10^{-6} M GA₄ behandelten Keimlinge niedrigere Transkriptgehalte des *CmGID1b* ermittelt.

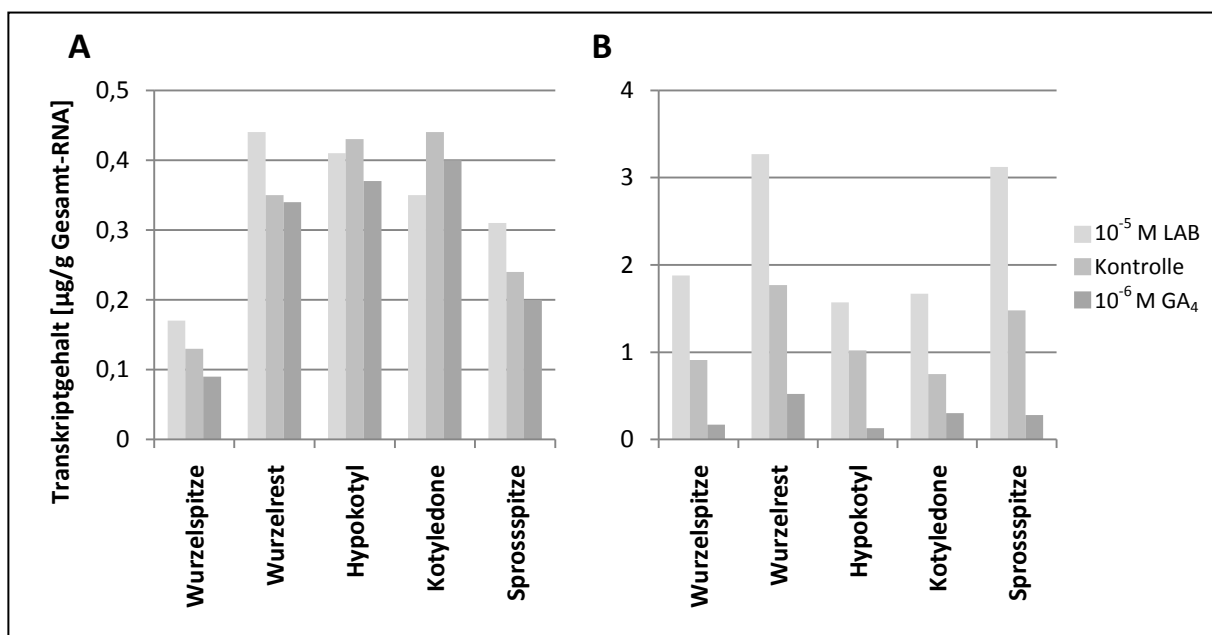


Abb. 3.20: Transkriptgehalte der *CmGID1a* (A) und der *CmGID1b* (B) in den Keimlingsorganen der 7 Tage alten mit Leitungswasser (0,1% Methanol), mit 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. mit 10^{-6} M GA₄ behandelten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.)

Dagegen weichen die ermittelten Transkriptgehalte des weiteren Rezeptor-Gens *CmGID1a* sowie der an der Gibberellin-Signaltransduktion beteiligten Gene *CmGAIPa* und *CmGAIPb* in

den mit LAB 150 978 bzw. in den mit GA₄ behandelten Keimlingen nicht von denen der Kontrolle ab (Abb. 3.20A; Abb. 3.21A, B).

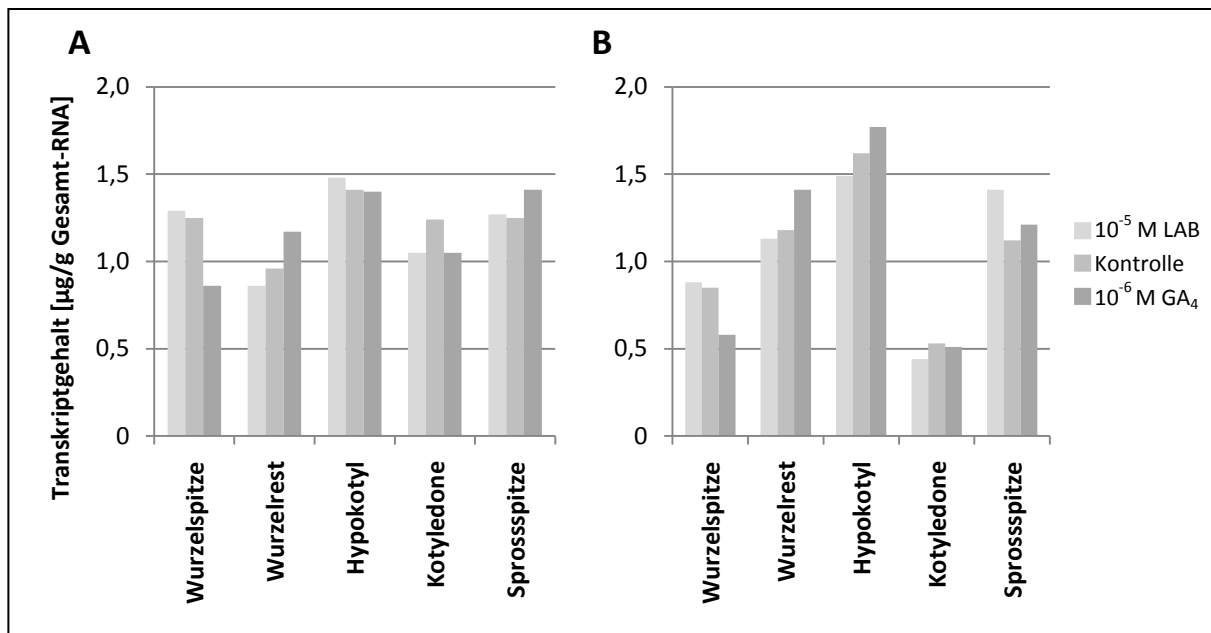


Abb. 3.21: Transkriptgehalte der *CmGAIPa* (A) und der *CmGAIPb* (B) in den Keimlingsorganen der 7 Tage alten mit Leitungswasser (0,1% Methanol), mit 10⁻⁵M LAB 150 978 bzw. mit 10⁻⁶M GA₄ behandelten Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.)

Somit konnte neben den Gibberellin-Biosynthese-Genen ein regulatorischer Einfluss auf die Transkription des Gibberellin-Rezeptor-Gens *CmGID1b* nachgewiesen werden, wobei die Veränderung der Expression durch Erhöhung bzw. Verringerung des endogenen Gibberellin-Gehalts schwächer ausgeprägt ist als bei den Gibberellin-Dioxygenasen.

3.3.4 Quantifizierung der Transkriptgehalte der am Gibberellin-Signalweg beteiligten Gene in männlichen Kürbisblüten

In männlichen Kürbisblüten konnte bisher keine zu den endogenen Gibberellinen korrelierende Expression einer Gibberellin 3-Oxidase ermittelt werden (Fischer, 2004; Knop, 2007). Daher wurde überprüft, ob die in Keimlingswurzeln identifizierte *CmGA3ox4* während der Blütenentwicklung expremiert wird und für die Synthese des ermittelten bioaktiven GA₄ in den Stamina verantwortlich ist.

Zusätzlich wurde zu einer vollständigen Aufklärung der Gibberellin-Biosynthese und der Gibberellin-Wirkung das Expressionsmuster der neu identifizierten *CmGA20ox4*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* sowie der Gibberellin-Rezeptor-Gene bestimmt. Dazu wurde die männliche Blütenentwicklung in vier Stadien unterteilt, wobei die Stadien I – III unterschiedlich

entwickelte Blütenknospen und das Stadium IV die geöffnete Blüte darstellen (Kap. 2.1.2). Dabei wurden für die Blüten der Stadien I – III das Hypanthium, die Sepalen und Petalen getrennt von den Stamina untersucht. Für das Stadium IV wurden dagegen alle vier Blütenorgane separat analysiert.

In früheren Untersuchungen der Gibberellin-Biosynthese in männlichen Blüten wurde für die bereits bekannten Gibberellin-Dioxygenase-Gene das Expressionsmuster lediglich in den in dieser Arbeit als Stadium I und Stadium IV bezeichneten männlichen Blütenstadien ermittelt (Fischer, 2004; Knop, 2007). Daher wurde zusätzlich das Expressionsmuster der *CmGA7ox*, *CmGA20ox3*, *CmGA3ox1*, *CmGA3ox2*, *CmGA3ox3* und *CmGA2ox1* in den mittleren Entwicklungsstadien bestimmt.

Die Quantifizierung der Transkriptgehalte mittels kompetitiver RT-PCR (Kap. 2.10) wurde für zwei unabhängige Pflanzenanzuchten durchgeführt, wobei im Folgenden die Ergebnisse einer Anzucht dargestellt sind. Im Anhang (Kap. 6.5) sind die Ergebnisse der zweiten Anzucht, die das Expressionsmuster der ersten bestätigen, sowie die zur Quantifizierung verwendeten Gelbilder abgebildet.

Gibberellin-Biosynthese

In den mittleren Entwicklungsstadien der männlichen Kürbisblüten liegen geringere Transkriptgehalte der *CmGA7ox* in den Stamina als in den anderen Organen vor, wobei das Gen im Stadium III stärker transkribiert ist als im Stadium II (Abb. 3.22).

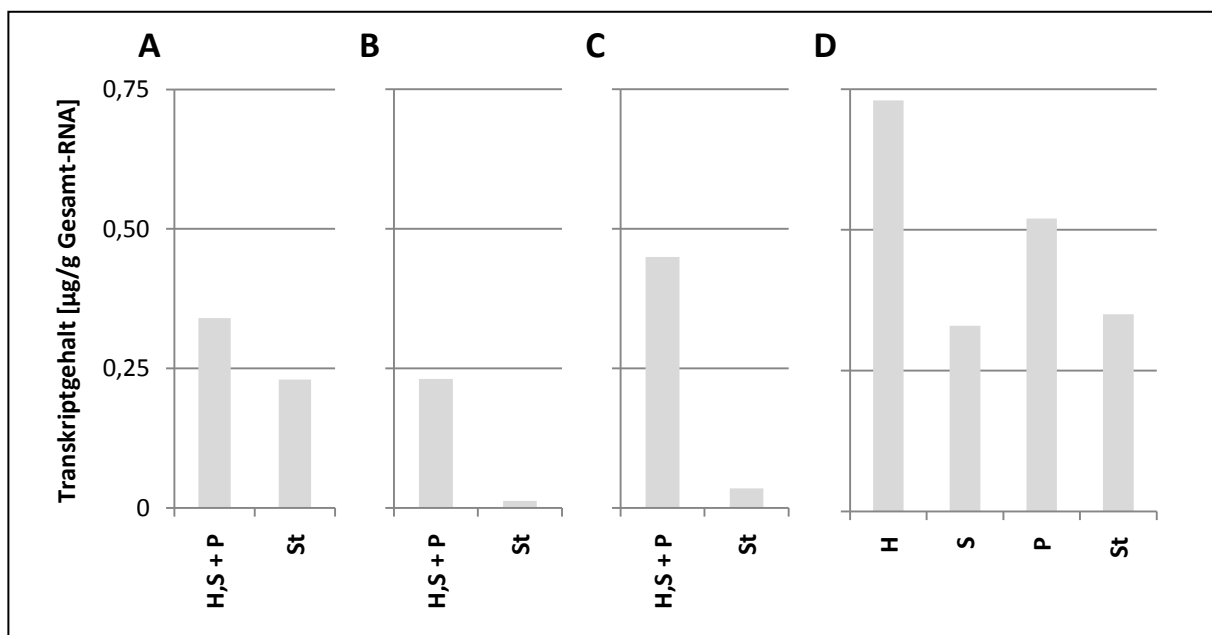


Abb. 3.22: Transkriptgehalt der *CmGA7ox* in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); die Transkriptgehalte für das Stadium I (A) und IV (D) sind für einen Vergleich Knop, 2007 entnommen; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

Im Gegensatz zu der *CmGA7ox* ist die Transkription der untersuchten Gibberellin 20-Oxidasen in den Stamina der Stadien I, II und III stärker ausgeprägt als in den anderen männlichen Blütenorganen (Abb. 3.23). Dabei wurden für die *CmGA20ox4* in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen des Stadiums II höhere Transkriptgehalte als im Stadium I nachgewiesen, wogegen die Stamina eine vergleichbar ausgeprägte Expression besitzen (Kap. 3.23A, B). Während der weiteren Entwicklung sinken die Gehalte an *CmGA20ox4*-mRNA, wobei die Verringerung in den Stamina stärker ausgeprägt ist (Abb. 3.23C). Im Stadium IV, der geöffneten Blüte, wurde ein erneuter Anstieg der Expression der *CmGA20ox4* verzeichnet (Abb. 3.23D). Dabei wurde der höchste Transkriptgehalt der *CmGA20ox4* im Hypanthium dieses Stadiums quantifiziert.

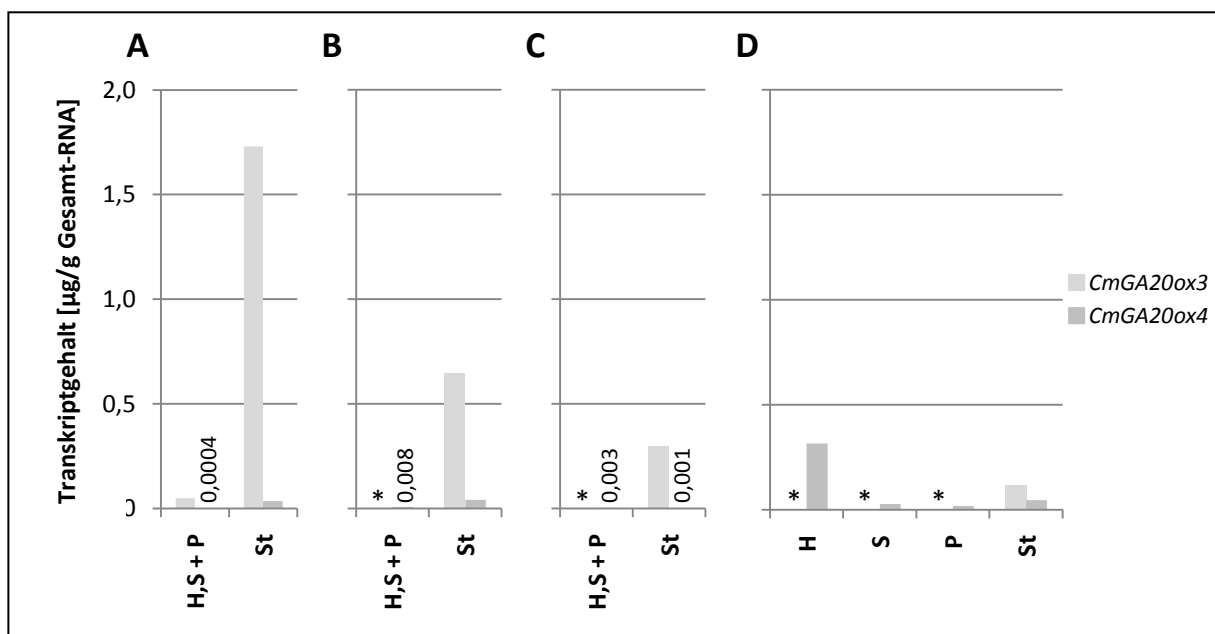


Abb. 3.23: Transkriptgehalte der *CmGA20ox3* und der *CmGA20ox4* in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); die Transkriptgehalte der *CmGA20ox3* für das Stadium I (A) und IV (D) sind für einen Vergleich Knop, 2007 entnommen; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,01 µg/g Gesamt-RNA

Vergleichbar zur *CmGA20ox4* wurden für die *CmGA20ox3* in den Stamina des Stadiums II höhere Transkriptgehalte nachgewiesen als in den Stamina des Stadiums III, wogegen in keinem der untersuchten Stadien Transkripte in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen amplifizierbar waren (Abb. 3.23B, C). In den Stamina kommen dabei höhere Transkriptgehalte der *CmGA20ox3* als der *CmGA20ox4* vor.

Transkripte der *CmGA3ox4* konnten erst ab dem Stadium II nachweisbar amplifiziert werden (Abb. 3.24A, B, C), wobei die Expression in den Stadien II und III auf die Stamina beschränkt

ist. In der geöffneten Blüte wurden geringere Transkriptgehalte der *CmGA3ox4* in den Stamina als in den Stadien davor und zusätzlich eine an der Nachweisgrenze liegende Transkription in dem Hypanthium ermittelt (Kap. 3.24D).

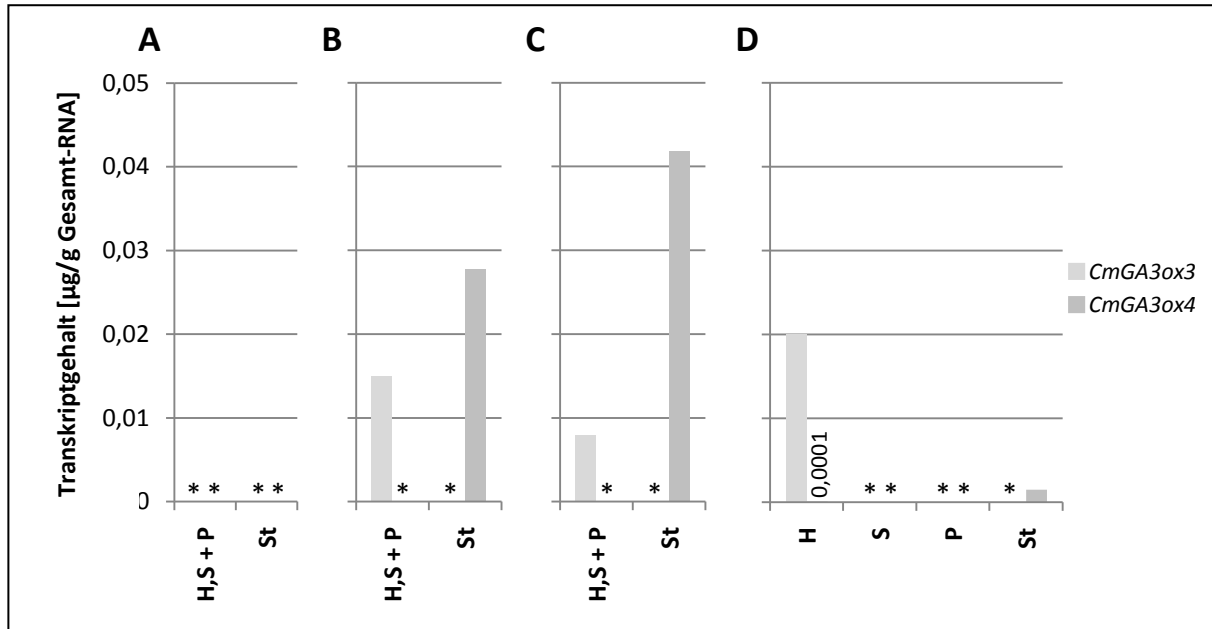


Abb. 3.24: Transkriptgehalte der *CmGA3ox3* und der *CmGA3ox4* in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); die Transkriptgehalte der *CmGA3ox3* für das Stadium I (A) und IV (D) sind für einen Vergleich Knop, 2007 entnommen; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,001 µg/g Gesamt-RNA (*CmGA3ox3*) bzw. 0,0001 µg/g Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*)

Im Gegensatz zu der *CmGA3ox4* konnte die *CmGA3ox3*-mRNA in den Stadien II und III lediglich in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen nachgewiesen werden (Abb. 3.24B, C). Für die anderen bekannten Gibberellin 3-Oxidase-Gene, *CmGA3ox1* und *CmGA3ox2*, konnten keine Transkripte in den Organen der männlichen Blüten nachweisbar amplifiziert werden (Kap. 6.5).

In männlichen Kürbisblüten sind somit lediglich die *CmGA3ox3* und *CmGA3ox4* transkribiert, wobei die Transkription in den mittleren Entwicklungsstadien getrennt voneinander in den unterschiedlichen Organen stattfindet.

Die *CmGA2ox3* besitzt eine vergleichbare Expression in den untersuchten Blütenorganen der Stadien I, II und III (Abb. 3.25A, B, C). Dagegen wurden für die *CmGA2ox1* in den mittleren Entwicklungsstadien höhere Transkriptgehalte in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen als in den Stamina bestimmt (Abb. 3.25B, C). Für beide Gibberellin 2-Oxidasen bleiben die Werte während dieser Stadien relativ konstant. Der Transkriptgehalt der *CmGA2ox3* nimmt während der weiteren Entwicklung zu, so dass in den Organen der

geöffneten Blüte bis zu 45-fach höhere Transkriptgehalte ermittelt wurden (Abb. 3.25D). Die Erhöhung der Transkription ist dabei in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen stärker ausgeprägt als in den Stamina, so dass dort höhere Transkriptgehalte quantifiziert wurden.

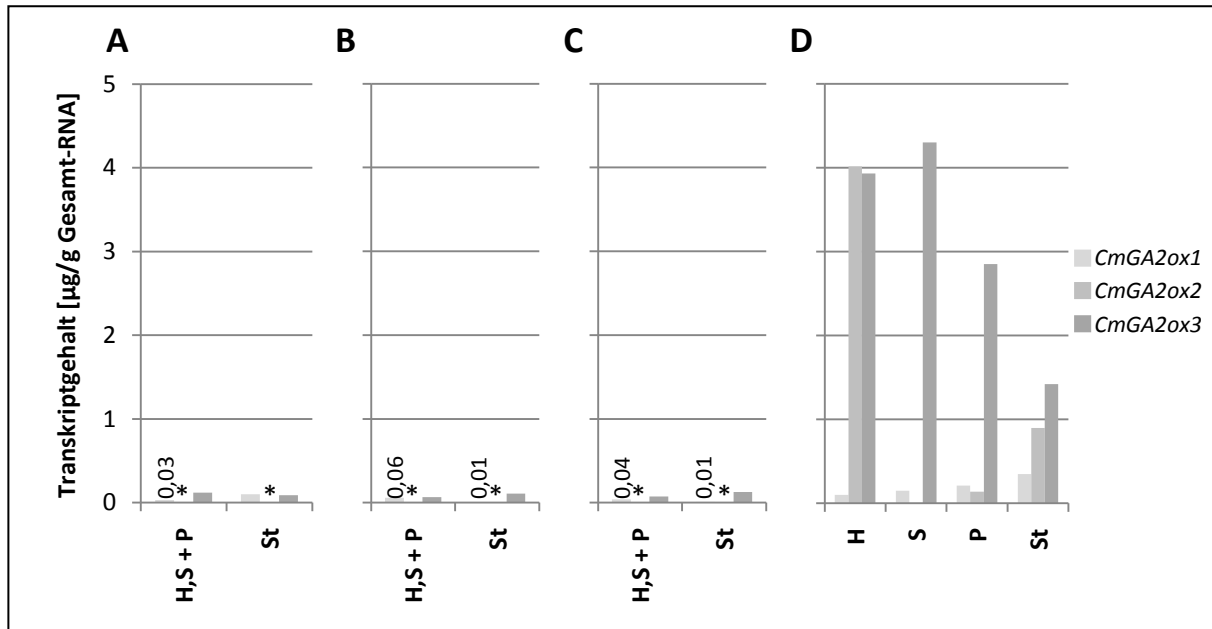


Abb. 3.25: Transkriptgehalte der *CmGA2ox1*, der *CmGA2ox2* und der *CmGA2ox3* in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); die Transkriptgehalte der *CmGA2ox1* für das Stadium I (A) und IV (D) sind für einen Vergleich Knop, 2007 entnommen; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,002 µg/g Gesamt-RNA

Die Expression der *CmGA2ox2* wurde zusätzlich zu den beiden anderen Gibberellin 2-Oxidasen untersucht. Jedoch sind die Transkriptgehalte in den Blütenorganen der Stadien I, II und III sehr gering, so dass eine Quantifizierung auf Grund zu schwacher Signale in den Gelen für diese Entwicklungsstadien nicht erfolgen kann. Die Transkriptgehalte liegen dabei unter 0,002 µg/g Gesamt-RNA. Vergleichbar zu der *CmGA2ox3* nimmt die Expression der *CmGA2ox2* während der weiteren Entwicklung zu, so dass im Stadium IV für das Hypanthium ein Transkriptgehalt von 4,01 µg/g Gesamt-RNA und für die Stamina von 0,9 µg/g Gesamt-RNA ermittelt werden konnte (Abb. 3.25D). Dagegen ist die Erhöhung in den anderen Blütenorganen nicht so stark ausgeprägt, so dass in den Sepalen und Petalen höhere Transkriptgehalte für die *CmGA2ox3* als für die *CmGA2ox2* bestimmt wurden.

In den männlichen Blütenorganen konnten somit Transkripte der *CmGA7ox*, *CmGA20ox3*, *CmGA20ox4*, *CmGA3ox3*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox1*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* nachgewiesen werden, wogegen die *CmGA3ox1* sowie die *CmGA3ox2* nicht expremiert sind.

Dabei zeigt die *CmGA7ox* während der Blütenknospenentwicklung eine stärkere Transkription in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen, wogegen Transkripte der *CmGA20ox3* und der *CmGA20ox4* in diesen Stadien hauptsächlich in den Stamina detektiert wurden. Im Gegensatz zu den Gibberellin 20-Oxidasen beginnt die Transkription der *CmGA3ox3* und der *CmGA3ox4* erst ab dem Stadium II, wobei die *CmGA3ox4* während der Blütenknospenentwicklung in den Stamina und die *CmGA3ox3* in den anderen Organen expremiert ist. Die *CmGA2ox1*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* besitzen die höchsten Transkriptgehalte in der geöffneten Blüte. Dabei ist die *CmGA2ox3* in der gesamten Blüte stark transkribiert, wogegen *CmGA2ox2* hohe Transkriptgehalte in dem Hypanthium und den Stamina aufweist.

Gibberellin-Perzeption

In dem jüngsten untersuchten Entwicklungsstadium wurden höhere Transkriptgehalte für *CmGID1b* als für *CmGID1a* bestimmt (Abb. 3.26A). Dabei ist die Transkription des jeweiligen Gens in den untersuchten Organen vergleichbar ausgeprägt. Während der Entwicklung der männlichen Blüte sinken die Gehalte an *CmGID1b*-mRNA, so dass ähnliche Werte wie für die relativ konstant transkribierte *CmGID1a* in den Stadien II und III ermittelt wurden (Abb. 3.26B, C). Die Expression beider Gene steigt in der geöffneten Blüte an, wobei eine stärkere Zunahme in den Transkripten der *CmGID1b* zu beobachten ist (Abb. 3.26D).

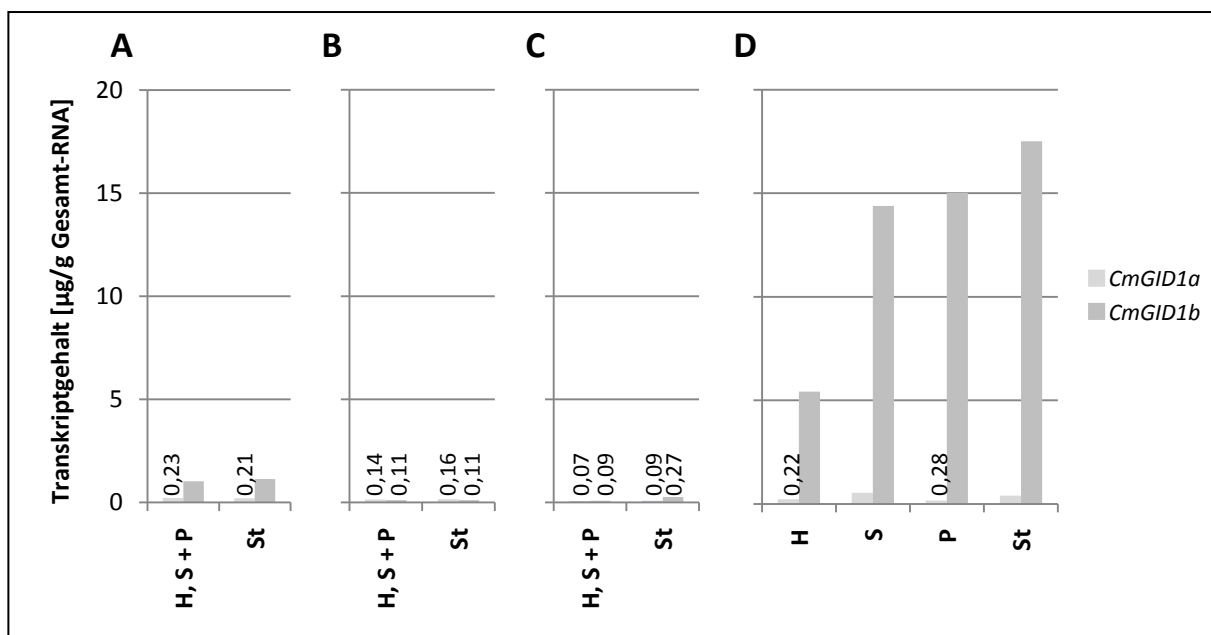


Abb. 3.26: Transkriptgehalte der *CmGID1a* und der *CmGID1b* in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

So nehmen die Transkriptgehalte der *CmGID1a* um einen Faktor von 2 – 5 und die der *CmGID1b* um einen Faktor von 50 – 150 zu. Die *CmGID1a* und die *CmGID1b* besitzen dabei eine schwächere Expression in dem Hypanthium als in den anderen Blütenorganen.

Neben der Expression der Gene der Gibberellin-Biosynthese konnte somit eine Transkription der für die Gibberellin-Rezeptoren kodierenden Gene in den männlichen Blütenorganen nachgewiesen werden. Dabei wurden die höchsten Transkriptgehalte der *CmGID1a* und der *CmGID1b* in der geöffneten Blüte quantifiziert, mit einer schwächeren Expression im Hypanthium als in den anderen Blütenorganen.

3.4 Identifizierung und Quantifizierung der endogenen Gibberelline in männlichen Kürbisblüten

Zur genaueren Aufklärung der Gibberellin-Biosynthese wurden die auf Transkriptgehalte der Gibberellin-Signalweg-Gene untersuchten Gewebe der männlichen Kürbisblüten zusätzlich auf den endogenen Gibberellin-Gehalt analysiert (Kap. 2.1.2). In früheren Untersuchungen wurden für das in dieser Arbeit untersuchte jüngste und älteste Stadium der Blütenentwicklung die endogenen Gibberelline bereits bestimmt, jedoch waren die Daten meist durch eine in der durchgeführten Methode auftretenden Kontamination mit endogenen Ionen nur bedingt aussagekräftig (Knop, 2007). Daher wurde die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit auch für diese Stadien durchgeführt.

Dazu wurden mittels kombinierter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Kap. 2.13.3) für zwei unabhängige Pflanzenanzuchten die endogenen Gibberelline der im Kapitel 2.1.2 dargestellten Stadien und Blütenorgane identifiziert und quantifiziert, wobei im Folgenden die Ergebnisse einer Anzucht dargestellt sind. Die Ergebnisse der zweiten Anzucht sind im Anhang (Kap. 6.6) abgebildet. Dabei konnte eine Untersuchung der Sepalen des Stadiums IV auf Grund zu geringer Materialmenge nicht erfolgen.

3.4.1 Gibberelline des Nicht-13-Hydroxylierungsweges

Der endogene GA₁₂-Gehalt, Produkt der Gibberellin 7-Oxidase, steigt in den Stamina während der männlichen Blütenentwicklung an, so dass ein Maximum von 5,8 ng/g

Frischgewicht im Stadium III vor der Blütenöffnung ermittelt werden konnte (Abb. 3.27). Dagegen liegt in dem Hypanthium, den Sepalen und Petalen der endogene Gehalt an GA_{12} relativ konstant und mit Ausnahme des Stadiums I geringer als in den Stamina vor.

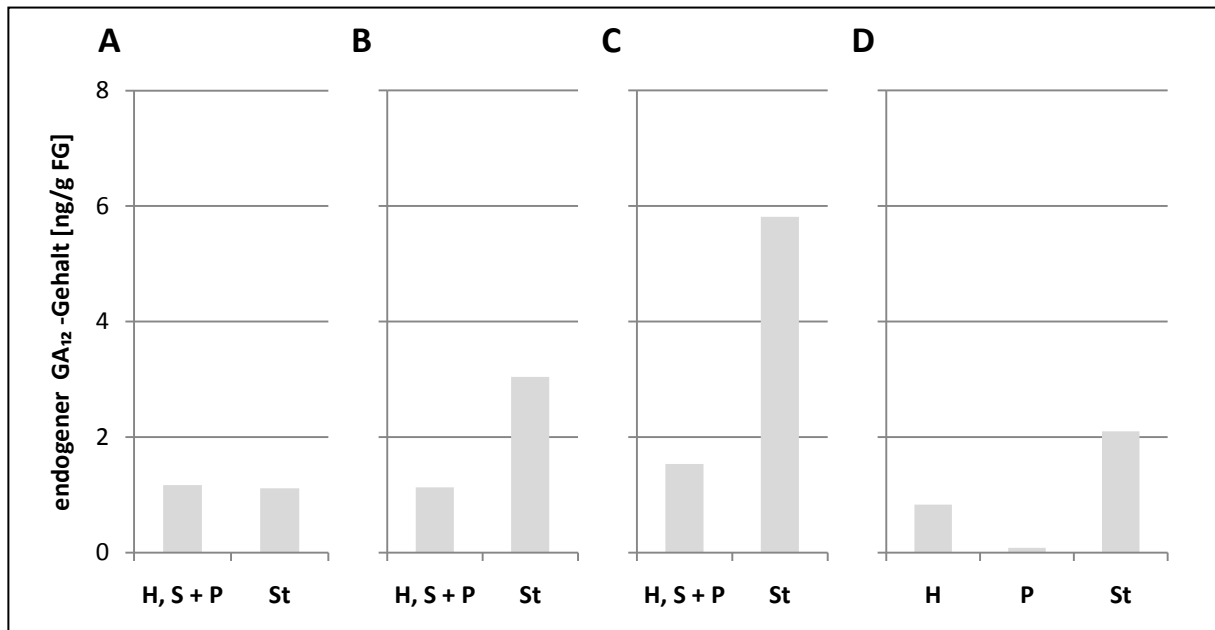


Abb. 3.27: Endogener GA_{12} -Gehalt in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

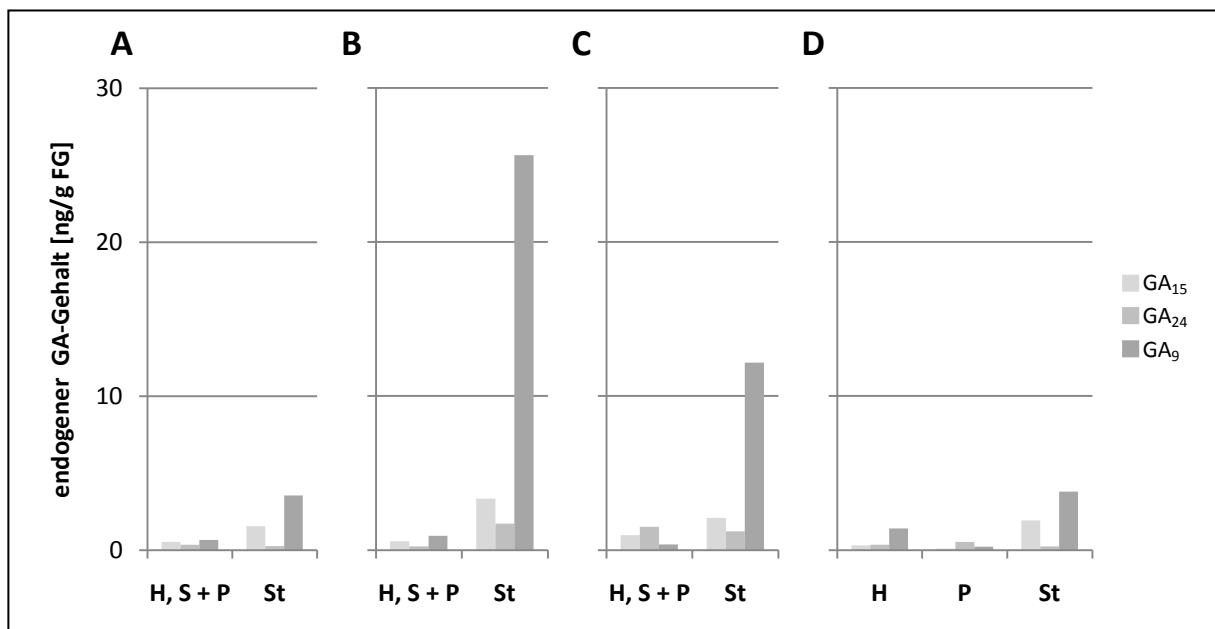


Abb. 3.28: Endogener GA_{15} -, GA_{24} - und GA_9 -Gehalt in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

Die Produkte der Gibberellin 20-Oxidase, GA_{15} , GA_{24} und GA_9 , besitzen in den Stamina vergleichbar zum endogenen Gehalt an GA_{12} höhere Gehalte als in den anderen Organen (Abb. 3.28). Dabei steigt besonders der endogene Gehalt an GA_9 , der direkten Vorstufe des bioaktiven Hormons, an, wobei der höchste Gehalt im Stadium II bestimmt werden konnte. Während der weiteren Entwicklung der Blüten sinkt der Gehalt, so dass im Stadium IV, nach erfolgter Blütenöffnung, ein vergleichbarer GA_9 -Gehalt in den Stamina wie im Stadium I vorliegt.

Das physiologisch aktive Hormon GA_4 zeigt vergleichbar zu den Vorstufen höhere endogene Gehalte in den Stamina als in den anderen Organen (Abb. 3.29). Der endogene GA_4 -Gehalt steigt während der Blütenentwicklung an mit einem Maximum im Stadium III, 6 – 18 Stunden vor der Blütenöffnung, von 52 ng/g Frischgewicht. Nach der erfolgten Blütenöffnung sinkt der endogene Gehalt an GA_4 rapide, so dass geringere Gehalte als im Stadium II ermittelt wurden.

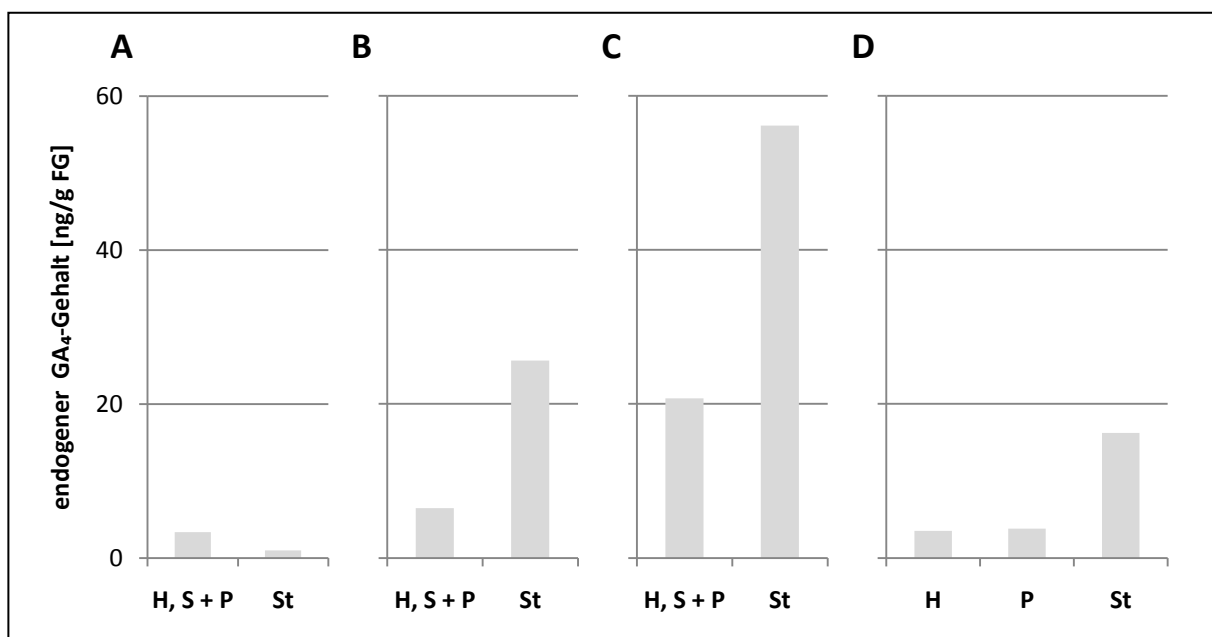


Abb. 3.29: Endogener GA_4 -Gehalt in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

Das durch Aktivität der Gibberellin 2-Oxidase gebildete GA_{51} , Katabolit von GA_9 , bzw. GA_{34} , Katabolit des aktiven GA_4 , konnte in den Organen während der Blütenentwicklung nachgewiesen werden (Abb. 3.30). Dabei liegen im Stadium I und II besonders hohe endogene Gehalte des GA_{51} in den Stamina vor, wogegen der endogene Gehalt des Abbauprodukts des GA_4 , GA_{34} , während der Blütenentwicklung ansteigt. Entsprechend zu den höheren GA_4 -Gehalten in den Stamina kommen dort höhere Gehalte an GA_{34} als in den anderen Organen vor.

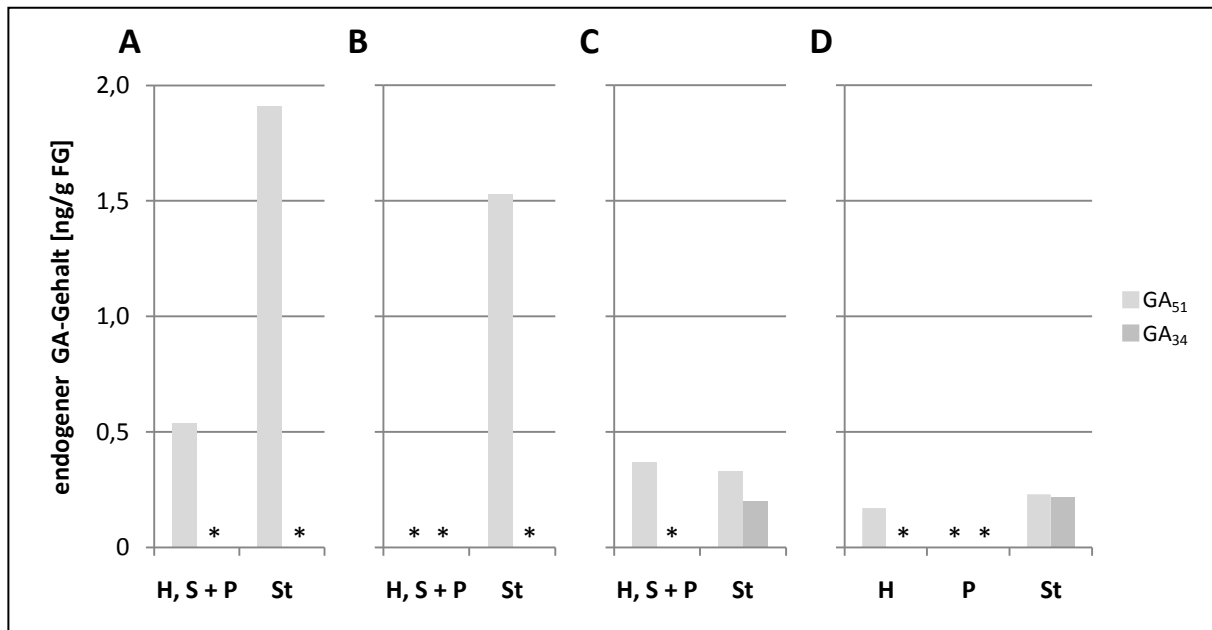


Abb. 3.30: Endogener GA₅₁- und GA₃₄-Gehalt in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I (A), des Stadiums II (B), des Stadiums III (C) und des Stadiums IV (D); H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * endogener GA-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 ng/g Frischgewicht

In den Stamina liegen somit höhere Gehalte an endogenen Gibberellinen als in den anderen Blütenorganen vor. Dabei steigen die Vorstufen des aktiven Hormons sowie das GA₄ während der Blütenentwicklung an, wobei das Maximum des endogenen GA₄-Gehalts im Stadium III und somit später als das der Vorstufe GA₉ liegt.

3.4.2 Gibberelline des 13-Hydroxylierungsweges

In den untersuchten Geweben der männlichen Blütenstadien liegen die Gibberelline des 13-Hydroxylierungsweges unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 ng/g Frischgewicht (Kap. 6.6). So konnte weder die 20-oxidierte Vorstufe GA₂₀, das aktive Hormon GA₁ noch das Abbauprodukt GA₈ in den Stamina, dem Hypanthium, den Sepalen oder den Petalen der vier Blütenstadien detektiert werden. Während der männlichen Kürbisblütenentwicklung werden somit die Gibberelline über den Nicht-13-Hydroxylierungsweg und nicht über den 13-Hydroxylierungsweg synthetisiert.

3.5 Einfluss von Gibberellin auf die vegetative und reproduktive Entwicklung von Kürbispflanzen

Der Einfluss von Gibberellin auf die vegetative und besonders auf die reproduktive Entwicklung von *Cucurbita maxima* wurde durch Behandlung mit einem Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese, LAB 150 978, untersucht. Durch die Reduzierung des endogenen Gehalts an bioaktiven Hormon und dem dadurch erzeugten GA-defizienten Phänotyp konnten Rückschlüsse auf die Wirkung von Gibberellin gezogen werden.

Die Kürbispflanzen wurden dazu von Beginn der Kultivierung mit einer 10^{-4} M LAB 150 978-Lösung bewässert, zusätzlich alle zwei Tage mit der Behandlung besprüht (Kap. 2.1.1) und zeigten einen zwergwüchsigen Phänotyp (Abb. 3.3.1). Dabei ist die Länge sowie Breite der Internodien signifikant reduziert, wogegen die Anzahl der Internodien unbeeinflusst ist (Kap. 6.7). Neben einen Einfluss auf das Wachstum der Internodien konnte eine abweichende Blattentwicklung bestimmt werden. Dabei werden die Blattstiellänge, die Blattlänge sowie die Blattbreite durch Behandlung mit dem Gibberellin-Biosynthese-Inhibitor signifikant reduziert (Kap. 6.7). Des Weiteren besitzen die mit 10^{-4} M LAB 150 978 behandelten Pflanzen keine Ranken, wogegen bei den Kontrollpflanzen ab dem Internodium 6 Ranken in den Blattachsen vorliegen.

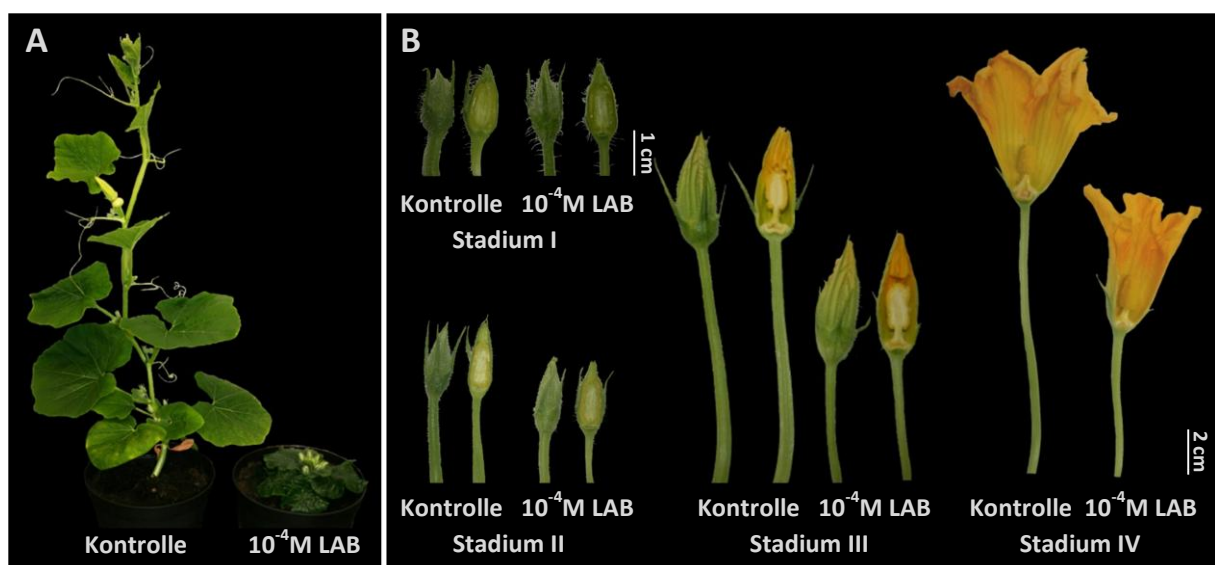


Abb. 3.31: (A) Phänotyp 43 Tage alter Kürbispflanzen (*Cucurbita maxima* L.) bei Behandlung mit Leitungswasser (0,1% Methanol) bzw. mit 10^{-4} M LAB; (B) Übersicht der Organe männlicher Kürbisblüten der Stadien I – IV bei Behandlung mit Leitungswasser (0,1% Methanol) bzw. mit 10^{-4} M LAB 150 978

Die Ausbildung der ersten Blüten erfolgt bei den Kontrollpflanzen und den mit 10^{-4} M LAB 150 978 behandelten Pflanzen durchschnittlich ab dem 14. Tag der Kultivierung in den

Blattachsen. Auch bei der weiteren Entwicklung konnte kein Unterschied beobachtet werden. So besitzen 43 Tage alte Pflanzen der LAB-Behandlung keine signifikant zu den Kontrollpflanzen abweichende Anzahl der im Kapitel 3.3.3 und 3.4 untersuchten Stadien der männlichen Blütenentwicklung (Tab. 3.4). Des Weiteren weisen die behandelten Pflanzen zwar eine durchschnittliche höhere Anzahl männlicher und eine durchschnittliche geringere Anzahl weiblicher Blüten auf, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant.

Tab. 3.4: Vergleich der Anzahl männlicher und weiblicher Blüten der 43 Tage alten Kürbispflanzen bei Behandlung mit Leitungswasser ($n = 4$) bzw. 10^{-4} M LAB 150 978 ($n = 4$)

	männliche Blüten					weibliche Blüten
	I	II	III	IV	gesamt	gesamt
Kontrolle	9 ± 2	4 ± 2	3 ± 3	4 ± 4	110 ± 23	6 ± 4
10^{-4}M LAB	9 ± 4	2 ± 2	3 ± 1	4 ± 3	131 ± 18	2 ± 3

Die Blüten der Stadien I, II, III und IV weisen keine morphologischen Unterschiede in der Entwicklung des Hypanthium, der Sepalen, der Petalen und der Stamina auf (Abb. 3.31). So besitzen das Hypanthium, die Sepalen, die Petalen sowie die Stamina der behandelten Pflanzen eine zu den Kontrollpflanzen entsprechende Ausbildung, Pigmentierung und Größe.

Tab. 3.5: Durchschnittliche Längen der Organe der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) der Stadien I – IV ($n = 10$, $n = 5$, $n = 5$ bzw. $n = 6$) bei Behandlung mit Leitungswasser (0,1% Methanol) bzw. mit 10^{-4} M LAB 150 978; bei den Stadien I, II und III wurde lediglich die Länge der außen sichtbaren Petalen vermessen; * signifikanter Unterschied nach Student's t-Test mit einem Signifikanzniveau von 5%

		Länge [cm]				
		Blütenstiel	Hypanthium	Sepalen	Petalen	Stamina
Stadium I	Kontrolle	$1,2 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
	10^{-4}M LAB	$1,0 \pm 0,1^*$	$0,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
Stadium II	Kontrolle	$8,7 \pm 3,8$	$0,8 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$
	10^{-4}M LAB	$2,0 \pm 0,1^*$	$0,6 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
Stadium III	Kontrolle	$12,5 \pm 2,9$	$1,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,2$
	10^{-4}M LAB	$3,5 \pm 0,3^*$	$0,9 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,2$
Stadium IV	Kontrolle	$13,2 \pm 4,2$	$1,6 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,3$	$6,4 \pm 1,0$	$2,0 \pm 0,2$
	10^{-4}M LAB	$6,7 \pm 1,3^*$	$1,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$

Dagegen konnte für den Blütenstiel eine signifikante Reduzierung des Wachstums beobachtet werden, wobei der Unterschied während der Entwicklung zunimmt (Tab. 3.5). So ist im Stadium I die Verkürzung des Blütenstiels nur gering ausgeprägt, wogegen in den Stadien II, III und IV die Länge bis zu viermal geringer ist.

Die Öffnung der männlichen Blüten erfolgt zwischen dem 40. und 43. Tag, wobei kein Unterschied zwischen der zeitlichen Blütenöffnung der mit LAB und der mit Leitungswasser behandelten Pflanzen beobachtet wurde. Des Weiteren enthielten die Antheren der mit LAB behandelten Pflanzen Pollen.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des Hemmstoffes in Kürbisblüten wurde der endogene Gibberellin-Gehalt quantifiziert. In den Petalen und den Stamina der mit 10^{-4} M LAB 150 978 behandelten Pflanzen konnten endogene Gibberelline nachgewiesen werden (Tab. 3.6), wobei die Stamina des Stadiums III der LAB 150 978 behandelten Pflanzen einen GA_4 -Gehalt von 13,5 ng/g Frischgewicht aufweisen. Der Gehalt des aktiven Hormons wurde somit durch die 10^{-4} M LAB 150 978-Behandlung um ca. 85% reduziert.

Tab. 3.6: Endogener GA-Gehalt [ng/g Frischgewicht] in den Petalen und Stamina der männlichen Kürbisblüten der Entwicklungsstadien III und IV der mit Leitungswasser (0,1% Methanol) bzw. mit 10^{-4} M LAB 150 978 behandelten Kürbispflanzen (*Cucurbita maxima* L.); * endogener GA-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 ng/g Frischgewicht

		Petalen			Stamina		
		GA_9	GA_4	GA_{34}	GA_9	GA_4	GA_{34}
Stadium III	Kontrolle	*	3,4	*	7,7	96,6	0,3
	10^{-4} M LAB	*	0,6	*	3,9	13,5	*
Stadium IV	Kontrolle	*	0,6	*	3,7	7,0	0,7
	10^{-4} M LAB	*	1,0	*	0,9	2,2	0,2

3.6 Etablierung eines Virus induzierten Gen-Silencing-Systems

Für die in dieser Arbeit verwendete Kürbisart ist eine genetische Manipulation und somit die Bestimmung der Genfunktion nur bedingt möglich. Daher sollte zur Untersuchung der exakten Funktion der Mitglieder der an den Gibberellin-Signalwegen beteiligten Multigenfamilien ein zu einer stabilen Transformation alternatives System etabliert werden. Dazu wurden Kürbiskeimlinge (Kap. 3.6.1) und Gurkenkeimlinge (Kap. 3.6.2) mit einem auf den

Tobacco Rattle Virus basierenden System zum Virus induzierten Gen-Silencing (VIGS) infiziert. Zur Etablierung des Systems wurde als Marker die Phytoene-Desaturase (PDS), kodierend für ein an der Carotenoid-Biosynthese beteiligten Enzyms, verwendet. In Kürbis war die Sequenz der *PDS* noch nicht bekannt, weswegen degenerierte Primer unter Verwendung von bekannten *PDS*-Sequenzen hergestellt und in einer PCR mit cDNA aus 7 Tage alten Kürbisspross eingesetzt wurde (Kap. 2.14.1). Das amplifizierte Fragment wurde anschließend in den TRV-Vektor pYL156 kloniert und für das VIGS verwendet (Kap. 2.14). Die Sequenz des *CmPDS* ist im Anhang (Kap. 6.3) dargestellt.

3.6.1 Virus induziertes Gen-Silencing in Kürbis

Die Kürbiskeimlinge wurden mit dem viralen Vektor *CmPDS*-pYL156 bzw. pYL156 ohne Insert infiziert. Dazu wurden verschiedene Infizierungsmethoden getestet (Kap. 2.14.2), wobei bei der Verwendung der Agroinfiltration einige Schwierigkeiten auftraten. So konnte lediglich unter großem Druck die Bakteriensuspension in die Unterseite der Kotyledonen injiziert werden, wodurch Verletzungen resultierten, welche in einigen Fällen sogar zum Absterben der Kotyledonen und somit vom Keimling führten. Des Weiteren war die Verbreitung der Suspension in den Kotyledonen begrenzt, so dass die Infizierung an bis zu 6 Stellen pro Kotyledone erfolgen musste, um eine annähernd vollständige Infiltration zu erreichen. Dabei wurde beobachtet, dass die Bakteriensuspension teilweise durch die Spaltöffnungen wieder austrat. Bei Verwendung von Tabakpflanzen als Kontrollansatz der Methode traten diese Schwierigkeiten dagegen nicht auf.

Die durch Agroinfiltration infizierten Kürbispflanzen besaßen keinen zu den Wildtyppflanzen abweichenden Phänotyp. So konnte bei den mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen 4 Wochen nach der Infizierung kein Unterschied zu den Kontrollpflanzen in der Pigmentierung der Blätter, des Sprosses oder der Blüten beobachtet werden (Abb.3.32A).

Zur Überprüfung der Methode und der Materialien wurden Tabakpflanzen mit *NbPDS*-pYL156 bzw. *CmPDS*-pYL156 infiziert. 8 Tage nach der Infizierung setzte die erwartete Weißfärbung der Blätter und des Sprosses der mit *NbPDS*-pYL156 infizierten Tabakpflanzen ein (Abb. 3.32B; Liu et al., 2002a), die sich während der weiteren Kultivierung ausbreitete. Durch die Infizierung mit *CmPDS*-pYL156 (Identität zu *NbPDS*: 76%; GenBank: EU165355) wurde dagegen lediglich ein zu den mit pYL156 infizierten Tabakpflanzen entsprechender Phänotyp ausgebildet.

Die Kultivierung der Keimlinge im Infiltrationsmedium, die Sprossinjektion sowie die Infizierung mit in Tabakpflanzen gebildeten Virenpartikeln (Kap. 2.14.2) führte vergleichbar

zu der Agroinfiltration zu keiner zu den Kontrollpflanzen abweichenden Färbung der Blätter oder des Sprosses in Kürbis (Abb. 3.33).

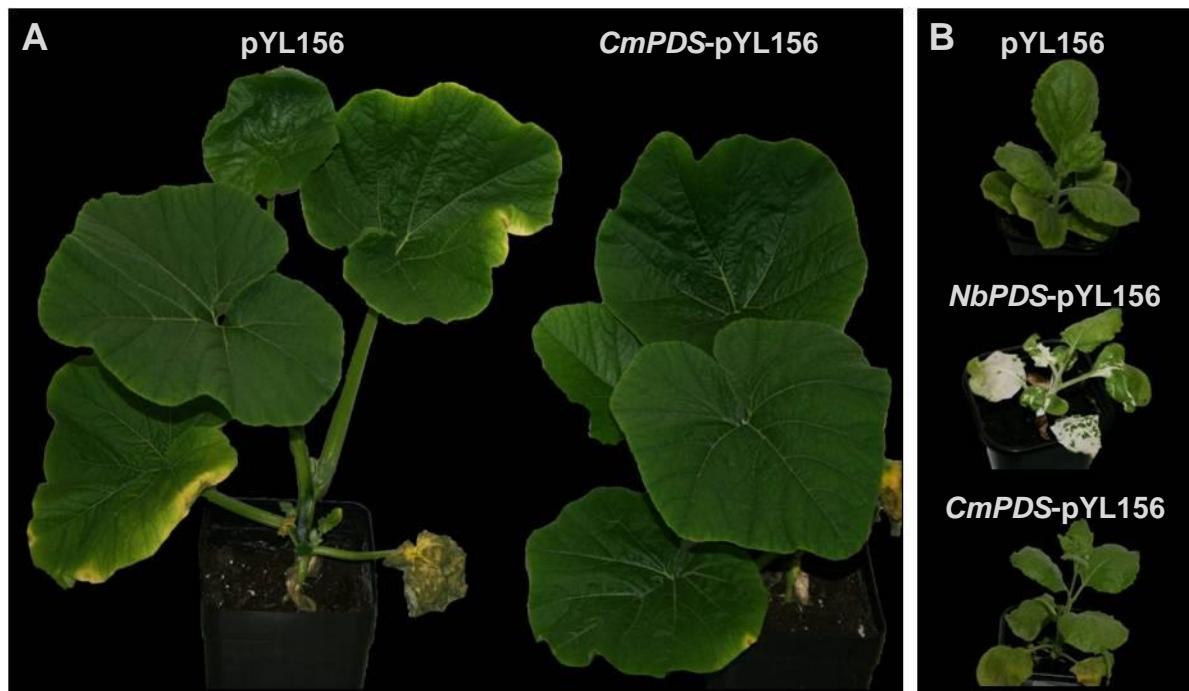


Abb. 3.32: (A) Phänotyp 35 Tage alter Kürbispflanzen (*Cucurbita maxima* L.) 28 Tage nach der Agroinfiltration mit pYL156 bzw. mit *CmPDS*-pYL156; (B) Phänotyp 49 Tage alter Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana* L.) 25 Tage nach der Agroinfiltration mit pYL156, mit *NbPDS*-pYL156 bzw. mit *CmPDS*-pYL156

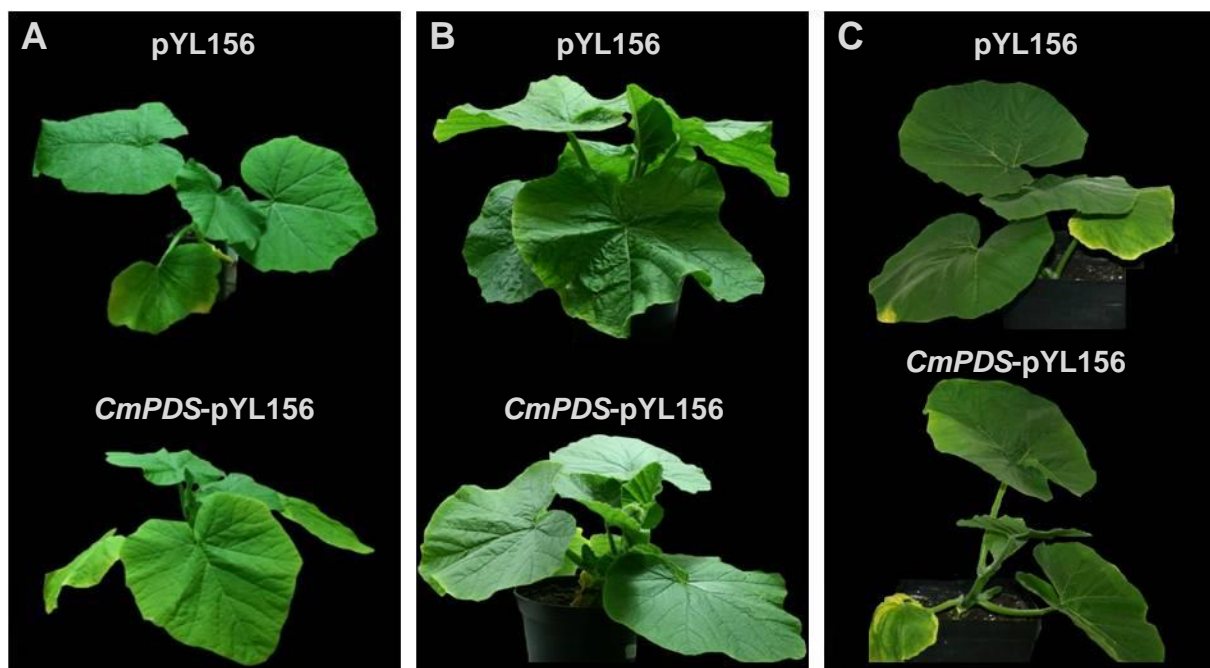


Abb. 3.33: Phänotyp 35 Tage alter Kürbispflanzen (*Cucurbita maxima* L.) 28 Tage nach Infizierung mit pYL156 bzw. mit *CmPDS*-pYL156 durch Wachstum im Infiltrationsmedium (A), durch Sprossinjektion (B) bzw. durch aus Tabak extrahierten Virenpartikeln (C)

Auch die Veränderung der Wachstumsbedingungen durch Erniedrigung der Temperatur auf 20 – 22°C bzw. Erhöhung der Lichtintensität führte zwar zur verlangsamen Entwicklung aber nicht zu einer Weißfärbung der Pflanzen.

Die Blätter von mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen wurden 24 Tage nach Beginn der Sprossinjektion geerntet und auf die Transkripte des viralen Vektors mittels RT-PCR untersucht (Kap. 2.14.3). Mit dem vektorspezifischen Forward-Primer und dem PDS-Reverse-Primer wurde bei Verwendung der aus den ältesten Blättern der Kürbispflanzen extrahierten Gesamt-RNA ein ca. 500 bp großes Fragment amplifiziert, welches in der Größe dem Vektor mit PDS-Insert entspricht (Abb. 3.34). Dagegen führte die RT-PCR mit den vektorspezifischen Primern zur Amplifikation eines ca. 220 bp großen Fragments, welches um ca. 400 bp von der erwarteten Größe abwich und ungefähr dem Vektor ohne Insert entspricht.

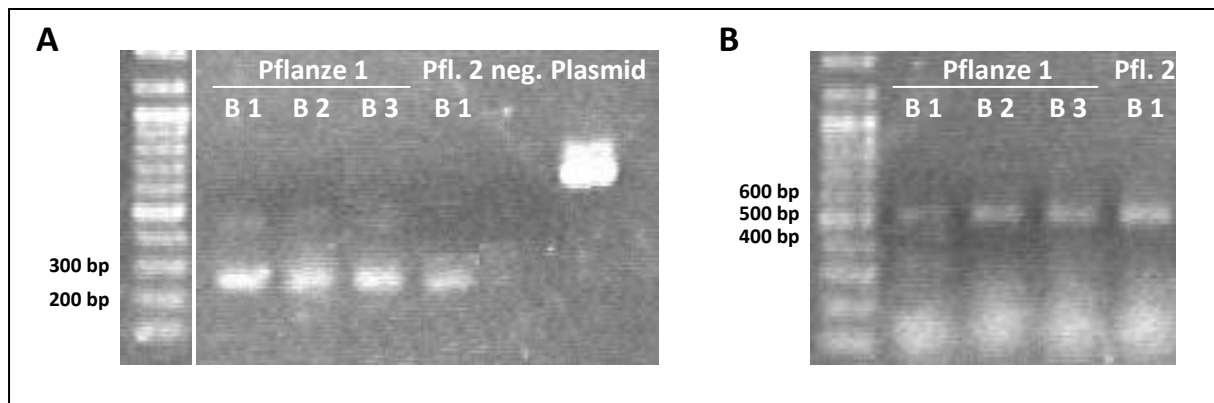


Abb. 3.34: Nachweis der viralen RNA in den Blättern der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Kürbispflanzen; (A) Verwendung von vektorspezifischen PCR-Primern; (B) Verwendung des vektorspezifischen Forward-Primers mit dem PDS-Reverse-Primer

Bei Verwendung von Plasmid-DNA, die aus dem verwendeten Agrobakterienklon extrahiert wurde, war dagegen lediglich eine Bande bei der erwarteten Größe von ca. 620 bp sichtbar. Auch bei weiteren Untersuchungen wurde stets in den mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen die in der Größe abweichende virale RNA nachgewiesen (Kap. 6.8).

In den infizierten Kürbispflanzen konnte die virale RNA und somit die Transformation der Pflanzen sowie die Transkription und Verbreitung des Virus nachgewiesen werden. Jedoch konnte in den Kürbispflanzen durch keine der verwendeten Infizierungs- und Kultivierungsbedingungen ein Gen-Silencing erzielt werden.

3.6.2 Virus induziertes Gen-Silencing in Gurke

Gurkenkeimlinge wurden entsprechend zu den Kürbiskeimlingen mit den in Tabakpflanzen gebildeten Virenpartikeln infiziert (Kap. 2.14.2). Dazu wurde der virale Vektor pYL156 bzw. *CmPDS*-pYL156 verwendet, wobei die Sequenz des *CmPDS*-Fragments eine 86%ige Identität zu *CsPDS* aufweist (Cucumber Genome Database: Csa002881).

Im Gegensatz zu den Kürbispflanzen konnte eine abweichende Pigmentierung der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen zu den Kontrollpflanzen beobachtet werden (Abb. 3.35).

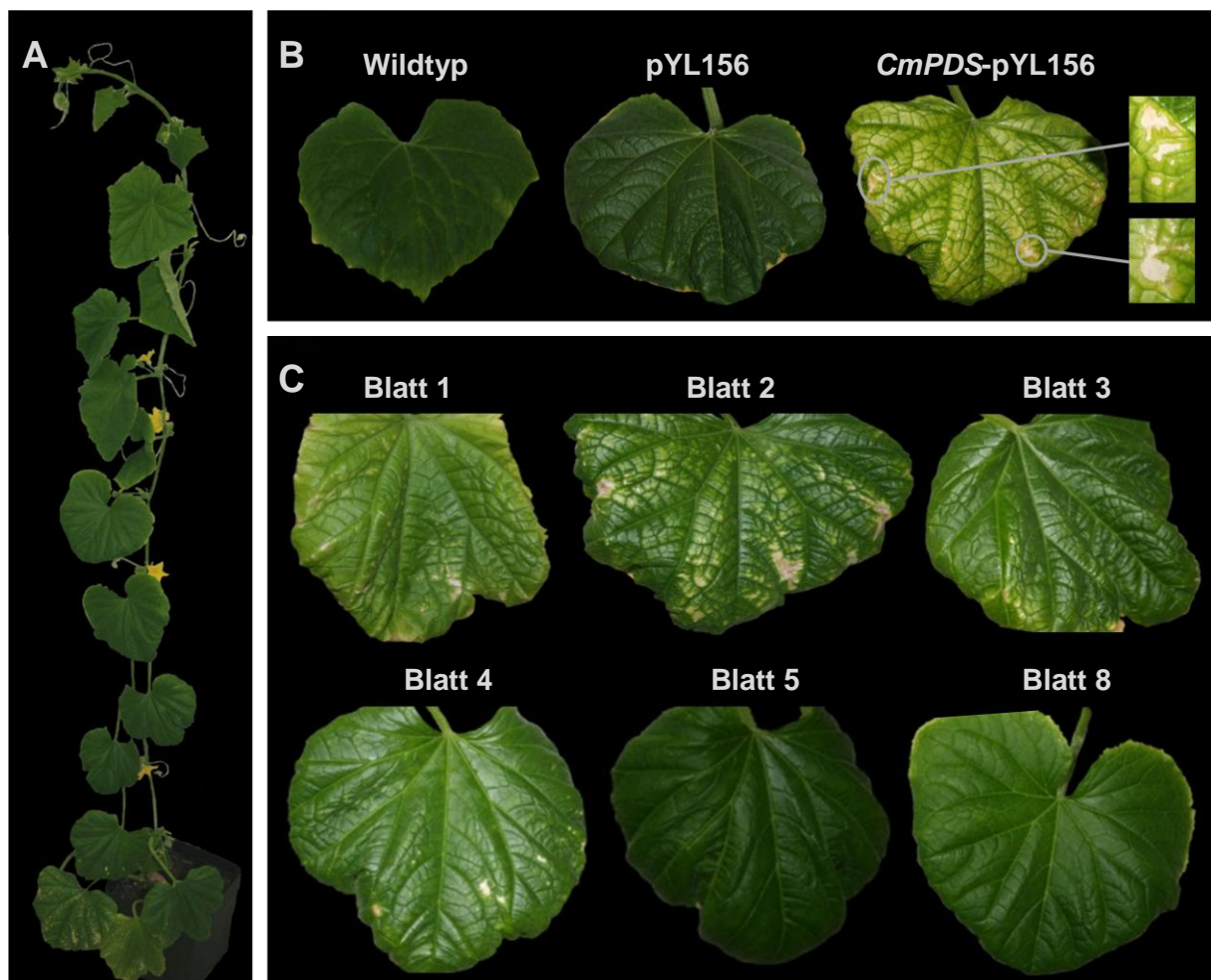


Abb. 3.35: Übersicht über die Verbreitung des Gen-Silencings bei Verwendung von Virenpartikeln zur Infizierung von Gurkenpflanzen (*Cucumis sativus* L.); (A) Phänotyp einer 45 Tage alten Gurkenpflanze 38 Tage nach Infizierung mit *CmPDS*-pYL156; (B) Phänotyp des 2. Blattes des 28 Tage alten Wildtyps sowie der mit dem leeren Vektor bzw. mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Gurkenpflanze 21 Tage nach der Infizierung mit den Virenpartikeln; (C) Phänotyp der Blätter der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen 38 Tage nach der Infizierung

Dabei traten die ersten weißen Bereiche 21 Tage nach der Infizierung auf dem zweiten Blatt und erst später auf dem ersten Blatt auf (Abb. 3.35B). Während der Kultivierung stieg die

Anzahl der Blätter mit abweichender Pigmentierung und die Weißfärbung breitete sich auf den Blättern aus, wobei jedoch keine vollständige Bleichung der Blätter nach 38 Tagen vorlag. Die Weißfärbung war dabei auf die Blätter 1 – 4 der Gurkenpflanze des 14-Blattstadiums (Abb. 3.35A) beschränkt und lediglich zwei von sechs infizierten Pflanzen besaßen einen veränderten Phänotyp. Auch bei der Wiederholung des Versuchs wurden weiße Bereiche auf den ältesten Blättern einer von sechs infizierten Pflanzen beobachtet, wobei erneut keine komplette Weißfärbung der Blätter auftrat.

Aus den Blättern der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanze (Abb. 3.35) wurde 38 Tage nach der Infizierung die Gesamt-RNA extrahiert und auf Transkripte des viralen Vektors überprüft (Kap. 2.14.3). Virale RNA konnte sowohl in den Blättern 2 und 4, die weiße Bereiche aufwiesen, als auch in dem Blatt 8, bei dem keine Bleichung beobachtet werden konnte, nachgewiesen werden (Abb. 3.36A).

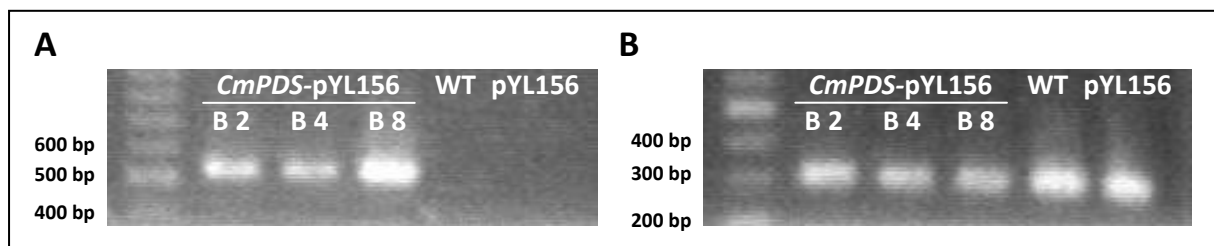


Abb. 3.36: (A) Nachweis der viralen RNA in den Blättern des Wildtyps, der mit pYL156 bzw. der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Gurkenpflanzen; (B) semiquantitative RT-PCR zur Ermittlung der relativen Transkriptgehalte an *CsPDS* in den Blättern des Wildtyps, der mit pYL156 bzw. der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen; B: Blatt, WT: Wildtyp

Des Weiteren wurde eine semiquantitative RT-PCR zur Bestimmung des relativen Transkriptgehalts an *CsPDS* durchgeführt (Kap. 2.14.3). Dabei wurde eine vergleichbare Transkription in den Blättern des Wildtyps und der mit pYL156 infizierten Pflanze ermittelt (Abb. 3.36B). In den Blättern 2, 4 und 8 der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanze konnten zwar entsprechend Transkripte des *CsPDS* detektiert werden, jedoch war die Intensität der Banden schwächer ausgeprägt als bei den Kontrollpflanzen. Die Transkription des *CsPDS* in den mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen war somit reduziert und bestätigt das im Phänotyp erkennbare Gen-Silencing des *CsPDS*. Damit zeigt das verwendete VIGS-System, basierend auf den Tobacco Rattle Virus, Potential zum Gen-Silencing in Gurkenpflanzen.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung neuer Gibberellin-Dioxygenasen in Kürbiskeimlingen

Die Synthese sowie Deaktivierung des bioaktiven Gibberellins erfolgt im letzten Abschnitt der Gibberellin-Biosynthese durch die enzymatische Aktivität von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. In Kürbis (*Cucurbita maxima* L.) wurden Mitglieder dieser Multigenfamilien sowohl aus dem Samen als auch aus Wurzelspitzen von mit LAB 150 978, einem Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese (Jung et al., 1986), behandelten Keimlingen isoliert (Lange et al., 1994; Lange, 1997a; Lange et al., 1997b; Frisse et al., 2003; Lange et al., 2005; Pimenta Lange & Lange, 2006). Dabei weisen die *CmGA20ox1*, *CmGA20ox2*, *CmGA3ox1* und *CmGA3ox2* eine auf die Samenentwicklung beschränkte Expression auf (Frisse et al., 2003; Pimenta Lange & Lange, 2006). Die *CmGA7ox*, *CmGA20ox3*, *CmGA3ox3* und *CmGA2ox1* dagegen sind zu diversen Zeitpunkten der vegetativen und generativen Entwicklung expremiert (Frisse et al., 2003; Fischer, 2004; Lange et al., 2005; Pimenta Lange & Lange, 2006; Knop, 2007). So wurden hohe Transkriptgehalte im Hypokotyl unbehandelter Keimlinge, in dem bioaktives Gibberellin vorkommt, ermittelt (Lange et al., 2005). In der Wurzelspitze konnte dagegen keine zu den hohen endogenen Gibberellin-Gehalten korrespondierende Expression einer bekannten Gibberellin 20-Oxidase bzw. Gibberellin 3-Oxidase nachgewiesen werden, weswegen die Aktivität unbekannter Gibberellin-Dioxygenasen in diesem Gewebe vermutet wurde (Lange et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus Wurzelspitzen unbehandelter 7 Tage alter Kürbis-keimlinge vier cDNAs isoliert werden, die eine hohe Sequenzhomologie zu den bekannten Gibberellin-Dioxygenasen aus Kürbis und anderen Pflanzenarten aufweisen (Kap. 3.1). Dabei besitzen die neu identifizierten Gibberellin-Dioxygenasen die höchste Identität zu Gibberellin 20-Oxidasen, Gibberellin 3-Oxidasen bzw. Gibberellin 2-Oxidasen der Familie *Cucurbitaceae* (bezeichnet als *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox2* bzw. *CmGA2ox3*; Kap. 3.1.2).

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Gibberellin-Dioxygenasen wurde der kodierende Bereich in einen Expressionsvektor kloniert und die rekombinanten Proteine mit radioaktiv markierten Gibberellinen inkubiert (Kap. 3.2). Dabei wurde für die *CmGA20ox4* die für eine Gibberellin 20-Oxidase charakteristische Oxidation am C20-Atom beobachtet. So

führt die Inkubation mit [^{14}C]GA₁₂ zur Bildung der Zwischenprodukte GA₁₅ und GA₂₄ sowie des Endprodukts GA₉ (Kap. 3.2.1), welches als Substrat zur Synthese des bioaktiven GA₄ fungiert. Des Weiteren konnte bei einer direkten Inkubation mit [^{14}C]GA₂₄ neben der Bildung von GA₉ als Hauptprodukt zusätzlich die geringfügige Synthese des C₂₀-GA₂₅ beobachtet werden. Durch die CmGA20ox4 werden somit sowohl C₁₉-GAs als auch C₂₀-GAs als Endprodukt gebildet. Damit zeigt das Enzym eine vergleichbare Aktivität zu den aus Arabidopsis isolierten AtGA20ox1, AtGA20ox2 und AtGA20ox3, die aus GA₁₂ hauptsächlich GA₉ und zu einem geringen Teil GA₂₅ bilden (Phillips et al., 1995; At2301=AtGA20ox1, At2353=AtGA20ox2, YAP169=AtGA20ox3). Auch die bereits charakterisierte CmGA20ox3 weist eine Synthese von C₁₉-GAs als Hauptprodukt auf (Lange et al., 2005), wogegen durch Aktivität der CmGA20ox1 hauptsächlich C₂₀-GAs gebildet werden (Lange et al., 1994a; Lange et al., 1997c).

Die CmGA3ox4 weist die für eine Gibberellin 3-Oxidase charakteristische 3 β -Hydroxylierung auf. So wird wie für die anderen Gibberellin 3-Oxidasen aus Kürbis das bioaktive GA₄ aus GA₉ synthetisiert (Kap. 3.2.2; Lange et al., 1997b; Frisse et al., 2003; Lange et al., 2005).

Eine Deaktivierung des bioaktiven Gibberellins durch 2 β -Hydroxylierung konnte für die CmGA2ox2 und die CmGA2ox3 nachgewiesen werden. Dabei wurde wie für die CmGA2ox1 die Bildung von GA₃₄ aus GA₄ bzw. von GA₈ aus GA₁ ermittelt (Kap. 3.2.3; Frisse et al., 2003). Neben der Synthese des GA₃₄ wurde der weitere Katabolismus des GA₃₄ durch die enzymatische Aktivität der CmGA2ox2 beobachtet. So entstehen bei Inkubation des rekombinanten Proteins mit [^{14}C]GA₄ bzw. bei einer direkten Inkubation mit [^{14}C]GA₃₄ mehrere Katabolite, die Ähnlichkeiten zu den durch Aktivität der PcGA2ox1, AtGA2ox2 und AtGA2ox3 gebildeten GA₃₄-Katabolit aufweisen (Thomas et al., 1999). Die HPLC-Analyse legt nahe, dass auch die CmGA2ox3 das GA₃₄ zu mehreren Produkten katabolisiert.

Neben der 2 β -Hydroxylierung des aktiven Hormons konnte auch ein Katabolismus der C₁₉-Vorstufe GA₉ durch die CmGA2ox2 bzw. CmGA2ox3 nachgewiesen werden, wobei neben GA₅₁ auch das GA₅₁-Katabolit gebildet wird.

Die aus Wurzelspitzen isolierten cDNAs kodieren somit für Gibberellin-Dioxygenasen mit einer für die jeweilige Multigenfamilie charakteristischen, enzymatischen Aktivität. Damit sind vier Gibberellin 20-Oxidasen, vier Gibberellin 3-Oxidasen sowie drei Gibberellin 2-Oxidasen in Kürbis bekannt. Dabei scheinen die Gibberellin 3-Oxidasen und Gibberellin 2-Oxidasen in der Familie *Cucurbitaceae* hoch konserviert zu sein (Abb. 4.1). So besitzen die vier Gibberellin 3-Oxidasen und die drei Gibberellin 2-Oxidasen aus Kürbis jeweils ein Korrelat zu den Gibberellin-Dioxygenasen der mit Kürbis nahe verwandten Art *Cucumis sativus* (Huang et al., 2009). Auch die drei identifizierten Gibberellin 3-Oxidasen aus *Marah macrocarpa* (Ward et al., 2010), ebenfalls zur Familie der *Cucurbitaceae* gehörend, weisen eine eindeutige Zuordnung auf.

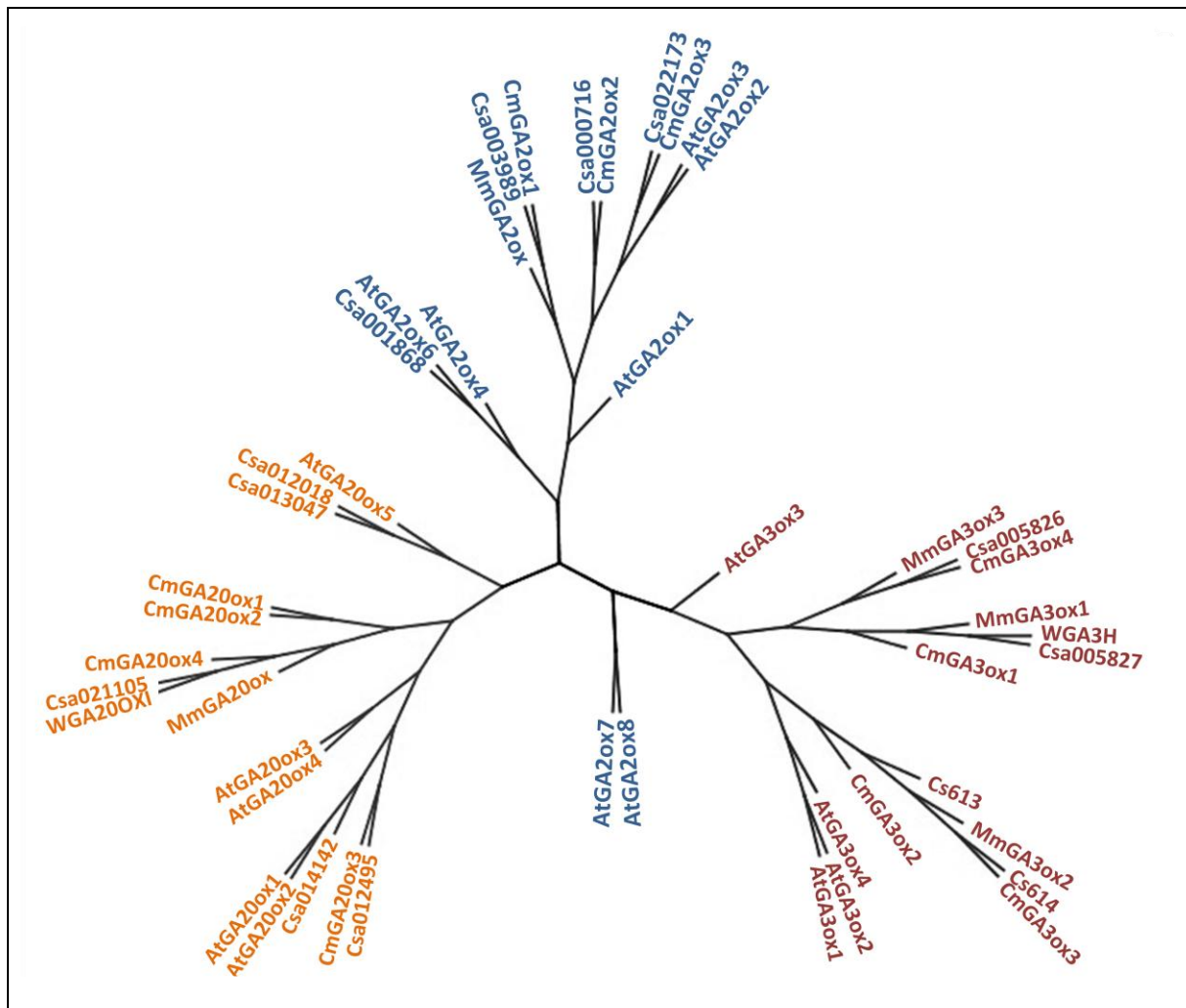


Abb. 4.1: Phylogenetischer Baum der kodierenden Aminosäuresequenzen der bekannten Gibberellin-Dioxygenasen von *Cucurbita maxima* (Cm), *Cucumis sativus* (Cs), *Citrullus lanatus* (WG), *Marah macrocarpa* (Mm) und *Arabidopsis thaliana* (At); der Baum wurde nach der Neighbor-Joining Methode mit dem Programm Geneious Pro 5.4 erstellt und die Sequenzen sind unter der nachfolgenden Accession Nr. in der GenBank bzw. der Gene ID in der Cucumber Genome Database erhältlich;

GenBank: *Cucurbita maxima*: CmGA20ox1 - 4 (X73314, U61385, AJ308480, FN808418), CmGA3ox1 - 4 (U63650, AJ006453, AJ302040, FN808419), CmGA2ox1 - 3 (AJ302041, FN808420, FN808421); *Cucumis sativus*: Cs613 (ACHR01000613; ORF: 29702 bp – 30198 bp, 30355 bp – 30982 bp), Cs614 (ACHR01000614; ORF: 8355 bp – 8848 bp, 8929 bp – 9559 bp); *Citrullus lanatus*: WGA20OXI (AF074709), WGA3H (AF074710); *Marah macrocarpa*: MmGA20ox (Y09112), MmGA3ox1 - 3 (HQ026483, HQ026484, HQ026485), MmGA2ox (Y09113); *Arabidopsis thaliana*: AtGA20ox1 - 5 (At4g25420, At5g51810, At5g07200, At1g60980, At1g44090), AtGA3ox1 - 4 (At1g15550, At1g80340, At4g21690, At1g80330), AtGA2ox1 - 8 (At1g78440, At1g20040, At2g34555, At1g47990, At1g02400, At1g50960, At4g21200)

Cucumber Genome Database: *Cucumis sativus*: Csa012018, Csa012495, Csa013047, Csa014142, Csa021105, Csa005826, Csa005827, Csa000716, Csa001868, Csa003989, Csa022173

In dem vollständig sequenzierten Genom der Gurke (*Cucumis sativus* L.) wurden fünf Gibberellin 20-Oxidasen und jeweils vier Gibberellin 3-Oxidasen bzw. Gibberellin 2-Oxidasen identifiziert (Huang et al., 2009).

Angesichts der hohen Konservierung in der Familie *Cucurbitaceae* könnten mit den aus Samen und Keimlingen isolierten CmGA3ox1 – 4 alle Gibberellin 3-Oxidasen aus Kürbis bekannt sein. Dagegen ist das Vorhandensein mindestens einer weiteren Gibberellin 2-Oxidase und weiterer Gibberellin 20-Oxidasen wahrscheinlich.

4. 2 Regulation der Genexpression

In vielen Pflanzenarten wurde ein regulatorischer Einfluss des Gibberellin-Gehalts auf die Expression der Gibberellin-Dioxygenase-Gene beobachtet (Phillips et al., 1995; Carrera et al., 1999; Matsushita et al., 2007; Carzoli et al., 2009; Gallego-Giraldo et al., 2008; Rieu et al., 2008a; Rieu et al., 2008b). Dabei weisen GA-defiziente Pflanzen eine erhöhte Expression der Gibberellin 20-Oxidasen und Gibberellin 3-Oxidasen bzw. eine reduzierte Expression der Gibberellin 2-Oxidasen auf. Entsprechend zeigen die *CmGA20ox4* und *CmGA3ox4* höhere Transkriptgehalte in mit LAB 150 978, einem Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese (Jung et al., 1986), behandelten Keimlingen bzw. geringere Transkriptgehalte in mit GA₄ behandelten Keimlingen (Kap. 3.3.2). Im Gegensatz dazu ist die Expression der *CmGA3ox2* zumindest in der Wurzelspitze nicht durch eine Reduzierung des endogenen Gibberellin-Gehalts reguliert, wobei eine erhöhte Expression in den anderen Keimlingsorganen nicht ausgeschlossen ist.

Die 'Feedback'-Regulation der *CmGA20ox4* und der *CmGA3ox4* ist dabei auf die Gewebe der Wurzel beschränkt, in denen Transkripte auch im unbehandelten Keimling nachweisbar waren. Die anderen Gewebe weisen keine oder eine an der Nachweisgrenze liegende Expression durch LAB 150 978-Behandlung auf. Die *CmGA20ox4* und *CmGA3ox4* unterliegen somit einer organspezifischen Expression, welche nicht durch den Gibberellin-Gehalt beeinflussbar ist. Für die *CmGA20ox3* und *CmGA3ox3* dagegen wurde eine 'Feedback'-Regulation in allen Keimlingsorganen beobachtet, wobei alle Gewebe zumindest eine geringfügige Expression im unbehandelten Keimling besitzen (Lange et al., 2005).

Die *CmGA2ox2* weist wie die bereits untersuchte *CmGA2ox1* keine 'Feedforward'-Regulation durch den endogenen Gibberellin-Gehalt auf (Kap. 3.3.2; Lange et al., 2005). Dagegen wurden durch Behandlung mit GA₄ höhere und durch Behandlung mit LAB 150 978 geringere Transkriptgehalte der *CmGA2ox3* in dem Wurzelrest, dem Hypokotyl und der

Kotyledone der Keimlinge nachgewiesen (Kap. 3.3.2). Damit scheinen die Gibberellin 2-Oxidasen unterschiedlichen Regulationsmechanismen zu unterliegen. Auch in anderen Pflanzenarten wurde beobachtet, dass die Expression nicht von allen Mitgliedern der Multigenfamilien durch den Gibberellin-Gehalt beeinflusst wird. So weisen Tabakpflanzen mit einer Überexpression einer Gibberellin 3-Oxidase, die in einer Erhöhung des endogenen bioaktiven Gibberellin-Gehalts resultiert, lediglich die *NtGA20ox1*, *NtGA3ox1*, *NtGA2ox3* und *NtGA2ox5* eine zum Wildtyp abweichende Expression auf (Gallego-Giraldo et al., 2008). Dagegen zeigen die *NtGA3ox2* und *NtGA2ox1* keine Regulation. Auch in Arabidopsis wurde lediglich eine veränderte Expression der *AtGA3ox1*, *AtGA2ox1*, *AtGA2ox2*, *AtGA2ox4*, *AtGA2ox6* und nicht der anderen Gibberellin-3-Oxidasen bzw. C₁₉-Gibberellin 2-Oxidasen ermittelt (Matsushita et al., 2007; Rieu et al., 2008b).

In Kürbis scheinen somit die *CmGA20ox3*, *CmGA20ox4*, *CmGA3ox3*, *CmGA3ox4* und *CmGA2ox3* an der Gibberellin-Homöostase während der Keimlingsentwicklung beteiligt zu sein, wobei die *CmGA20ox4* und *CmGA3ox4* eine wurzelspezifische Transkription besitzen. Neben den Gibberellin-Biosynthese-Genen wurde ein Einfluss des Gibberellin-Gehalts auf den Transkriptgehalt des Gibberellin-Rezeptor-Gens *CmGID1b* beobachtet. Bei Applikation von GA₄ wurde eine reduzierte und bei Behandlung mit LAB 150 978 eine erhöhte Transkription ermittelt, wobei die Änderung geringer als für die Biosynthese-Gene ausgeprägt ist (Kap. 3.3.2). Auch in Arabidopsis wurde eine Regulation der drei bekannten Gibberellin-Rezeptor-Gene durch den Gibberellin-Gehalt bestimmt (Griffiths et al., 2006; Iuchi et al., 2007; Rieu et al., 2008b). Dagegen zeigt das zweite in Kürbis bekannte Rezeptor-Gen *CmGID1a* durch Behandlung keine zum unbehandelten Keimling abweichende Transkription. Auch die Expression der Repressoren der Gibberellin-Antwort, *CmGAIPa* und *CmGAIPb*, ist nicht durch den Gibberellin-Gehalt regulierbar (Kap. 3.3.2).

In früheren Untersuchungen von Keimlingen konnte eine unvollständig prozessierte Form der *CmGA2ox2* identifiziert und isoliert werden (GenBank: AJ315662). Auch bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierung der *CmGA2ox2* und der *CmGA2ox3* wurden Fragmente sowohl mit als auch ohne Intron amplifiziert (Kap. 3.1.1). Die unterschiedlich prozessierten mRNAs wurden lediglich bisher bei den Gibberellin 2-Oxidasen beobachtet und scheinen auf eine post-transkriptionale Regulation am Schritt des Splicens hinzudeuten.

4.3 Gibberellin-Signalwege während der Keimlingsentwicklung

In früheren Untersuchungen wurden das Hypokotyl und die Wurzelspitze der Kürbiskeimlinge als Orte der Gibberellin-Biosynthese mit hohen endogenen Gehalten der Vorstufen und des bioaktiven GA₄ identifiziert (Lange et al., 2005). Dabei wurden im Hypokotyl hohe Transkriptgehalte der *CmGA20ox3* und der *CmGA3ox3* nachgewiesen, die entsprechend dem endogenen Gibberellin-Gehalt ein Maximum in 3 Tage alten Keimlingen besitzen (Abb. 4.2; Lange et al., 2005). Die anderen bekannten Gibberellin 20-Oxidasen und Gibberellin 3-Oxidasen weisen dagegen keine oder lediglich eine geringfügige Expression auf (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1; Lange et al., 2005; Frisse, 1999). Des Weiteren sind die für die Gibberellin-Rezeptoren kodierenden Gene im Hypokotyl während der Keimlingsentwicklung relativ konstant expremiert (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1), wobei die Expression der *CmGID1b* geringfügig stärker ausgeprägt ist als die der *CmGID1a*.

Das ermittelte Maximum des endogenen GA₄ bei 3 Tage alten Keimlingen korreliert mit dem Hypokotylwachstum, welches zwischen 3 und 5 Tage am stärksten ist, und deutet auf ein GA-abhängiges Wachstum des Hypokotyls hin. So führt die Behandlung von Kürbiskeimlingen mit GA₄ zu einem erhöhten Hypokotylwachstum, wogegen mit LAB 150 978, ein Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese (Jung et al., 1986), behandelte Keimlinge eine reduzierte Hypokotyllänge aufweisen (Kap. 2.1.2; Lange et al., 2005). Auch in anderen Pflanzen wurde ein vergleichbarer Einfluss des endogenen Gehalts an bioaktiven Gibberellin auf das Hypokotylwachstum beobachtet (Cosgrove & Sovonick-Dunford, 1989; Cowling & Harberd, 1999; Collet et al., 2000; Yaxley et al., 2001; Griffiths et al., 2006; Derbyshire et al., 2007).

Obwohl in der Kürbiswurzelspitze hohe endogene Gehalte der Vorstufen als auch des bioaktiven GA₄ ermittelt wurden, konnte lediglich in 3 Tage alten Wurzelspitzen eine korrelierende Expression der *CmGA20ox4* nachgewiesen werden (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1; Lange et al., 2005). Für die im Hypokotyl expremierte *CmGA20ox3* und die im Samen vorkommende *CmGA20ox1* konnten geringe bzw. keine Transkripte ermittelt werden (Abb. 4.2; Frisse, 1999; Lange et al., 2005). Des Weiteren besitzen die vier bekannten Gibberellin 3-Oxidasen lediglich geringe Transkriptgehalte in der Wurzelspitze (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1; Lange et al., 2005), wobei die *CmGA3ox4* eine steigende Expression während der Entwicklung in der Wurzel, besonders im Wurzelrest, aufweist und somit auf eine Funktion während der weiteren Pflanzenentwicklung nach 7 Tagen hindeutet.

Damit scheint im Hypokotyl spezifisch *CmGA20ox3* und *CmGA3ox3* an der Biosynthese des Gibberellins beteiligt zu sein, wogegen in der Wurzelspitze keine zu den endogenen Gibberellinen korrelierende Expression einer Gibberellin 20-Oxidase nach 3 Tagen und einer Gibberellin 3-Oxidase während der gesamten Entwicklung nachgewiesen werden konnte.

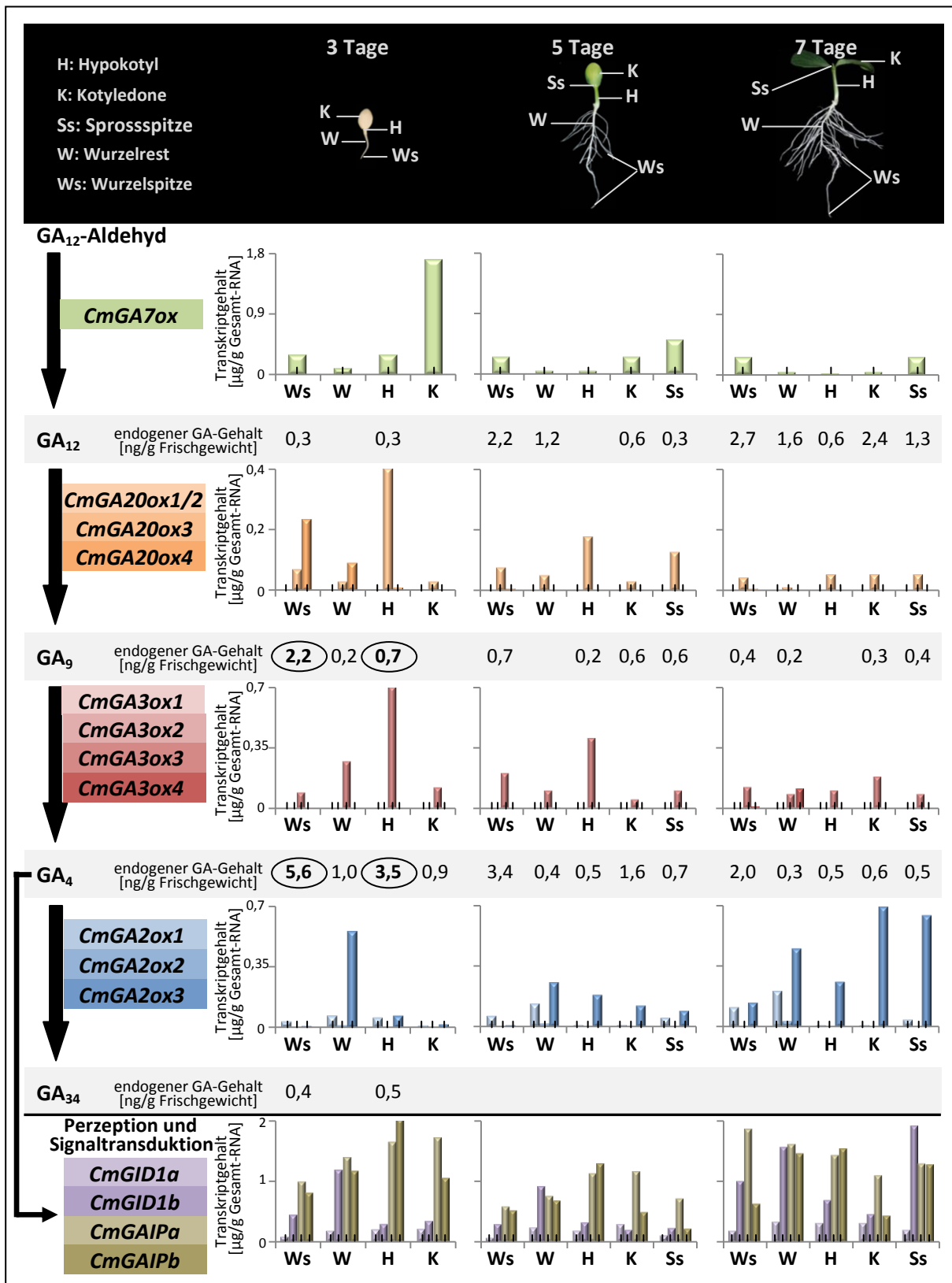


Abb. 4.2: Übersicht über die Gibberellin-Biosynthese in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen (*Cucurbita maxima* L.); die Transkriptgehalte der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox2*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox2*, *CmGA2ox3*, *CmGIDa*, *CmGID1b*, *CmGAIPa* und *CmGAIPb* sind in dieser Arbeit im Kap. 3.3.1 dargestellt, die anderen Transkriptgehalte sowie die endogenen Gibberellin-Gehalte sind Lange et al., 2005 bzw. Frisse, 1999 entnommen

In Tabak und Arabidopsis wurde die Expression der Gibberellin-Dioxygenase-Gene in der Wurzel und somit direkt am Ort der Gibberellin-Wirkung beobachtet. So wurde in Tabak eine Expression einer Gibberellin 3-Oxidase neben dem Spross in den Zellen des Wurzelmeristems lokalisiert (Itoh et al., 1999). In Arabidopsis liegen Gibberellin 20-Oxidasen und Gibberellin 3-Oxidasen sowohl im Spross als auch in der Wurzel vor (Mitchum et al., 2006; Rieu et al., 2008a), wobei die *AtGA3ox1*, *AtGA3ox2* und *AtGA3ox3* in unterschiedlichen Geweben des Sprosses und der Wurzel expremiert sind.

Auch in Kürbis scheinen die ermittelten endogenen Gibberelline direkt in der Wurzelspitze synthetisiert und nicht aus dem Hypokotyl importiert zu werden. So konnte im zellfreien System mit den aus 7 Tage alten Wurzelspitzen extrahierten Proteinen sowohl GA_{12} zu GA_{15} bzw. GA_{24} zu GA_9 als auch GA_9 zu GA_4 umgesetzt werden (Lange et al., 2005). In der Wurzelspitze kommen somit sowohl Enzyme mit Gibberellin 20-Oxidaseaktivität als auch Gibberellin 3-Oxidaseaktivität vor. Als mögliche Gibberellin-Dioxygenasen dieser Enzymaktivität wären die *CmGA20ox4* und *CmGA3ox4* denkbar. So konnten Transkripte der aus der Wurzelspitze isolierten *CmGA20ox4* und *CmGA3ox4* lediglich in den Geweben der Wurzel in 7 Tage alten Keimlingen nachgewiesen werden. Selbst durch die Behandlung mit LAB 150 978 wurde in den Sprossorganen keine oder nur eine an der Nachweisgrenze liegende Expression dieser Gene ermittelt (Kap. 3.3.2). Dies impliziert trotz der geringen Transkriptgehalte eine wurzelspezifische Funktion dieser Gene während der Keimlingsentwicklung.

In einigen Pflanzen wurde eine fluktuierende Expression der Gibberellin-Dioxygenase-Gene ermittelt. So zeigen die *StGA20ox1* und die *StGA20ox3* in der Kartoffel eine Zunahme der Expression während der Lichtphase mit einem Maximum ca. 1 – 4 Stunden nach Einsetzen der Dunkelheit und einer anschließenden Abnahme (Carrera et al., 1999). Die *StGA20ox2* dagegen weist relativ geringe Transkripte auf mit Maxima kurz nach Beginn und Ende der Beleuchtung. Auch in der Erbse und in Arabidopsis wurde eine Schwankung der Transkription der *PsGA20ox1* bzw. der *AtGA2ox1*, *AtGA2ox2*, *AtGA20ox1*, *AtGA20ox2* und *AtGA20ox3* ermittelt (García-Martínez & Gil, 2002; Zhao et al., 2007).

Die Ernte der Kürbiskeimlinge erfolgte immer 1 – 4 Stunden nach der Nachtphase. Es wäre daher denkbar, dass die *CmGA20ox4* und *CmGA3ox4* während der Keimlingsentwicklung wurzelspezifisch expremiert werden, wobei die Expression einer solchen Fluktuation unterliegt. Damit könnte eine höhere und mit den endogenen Gibberellin-Gehalten korrelierende Expression zu einem anderen Zeitpunkt des Tag-Nacht-Rhythmus stattfinden. Zur Verifizierung muss jedoch die Expression der Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Tag-Nacht-Rhythmus untersucht werden. Des Weiteren scheinen nicht alle Gibberellin 20-Oxidasen aus Kürbis bekannt zu sein, so dass die Aktivität eines unbekannten Enzyms nach 3 Tagen nicht ausgeschlossen werden kann.

Transkripte der in Kürbis bekannten Gibberellin-Rezeptoren konnten während der Keimlingsentwicklung nachgewiesen werden. Dabei ist *CmGID1a* gering sowie relativ konstant in den Organen und während der Entwicklung expremiert (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1). *CmGID1b* weist dagegen eine organ- und entwicklungsspezifische Transkription auf und scheint somit eine organ- und entwicklungsspezifische Funktion bei der Perzeption des physiologisch aktiven Gibberellins zu besitzen (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1). Dabei zeigt *CmGID1b* eine besonders hohe Expression in dem Wurzelrest während der gesamten Keimlingsentwicklung, wogegen die Wurzelspitze lediglich in 7 Tage alten Keimlingen entsprechend hohe Werte aufweist. Somit scheint in der frühen Keimlingsentwicklung *CmGID1b* eine wichtige Rolle in der Signalperzeption in der Wurzel zu besitzen und deutet auf einen Einfluss von Gibberellin auf die Wurzelentwicklung hin. So besitzen die mit LAB 150 978 behandelten Keimlinge zusätzlich zu einer reduzierten Hypokotyllänge eine verkürzte Wurzel (Kap. 2.1.2; Lange et al., 2005). Auch in Arabidopsis und Erbse weisen GA-defiziente Keimlinge eine reduzierte Wurzellänge auf (Yaxley et al., 2001; Fu & Harberd, 2003; Griffiths et al., 2006). Durch eine zusätzliche Mutation der an der Wurzelentwicklung beteiligten DELLAs bzw. durch Behandlung mit bioaktiven Gibberellin liegt ein zum Wildtyp entsprechendes Wachstum der Wurzel vor (Fu & Harberd, 2003; Griffiths et al., 2006; Weston et al., 2008).

Des Weiteren wurden hohe Transkriptgehalte des *CmGID1b* in der Sprossspitze 7 Tage alter Keimlinge ermittelt (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1). Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Entwicklung des ersten Internodiums und des ersten Blatts im Apikalmeristem. Hemmstoffversuche zeigen, dass die Internodienstreckung und Blattentwicklung in Kürbis durch Gibberellin reguliert wird (Kap. 3.5). Auch in anderen Pflanzen konnte ein Einfluss von Gibberellin auf die Sprossstreckung sowie Blattentwicklung nachgewiesen werden (Koorneef & van der Veen, 1980; Yaxley et al., 2001; Achard et al., 2009). Eine Biosynthese des bioaktiven Gibberellins konnte jedoch nicht in der Sprossspitze von Kürbiskeimlingen nachgewiesen werden, was auf einen Transport des Gibberellins aus dem Hypokotyl hindeutet.

Transkripte der Repressoren der Gibberellin-Antwort wurden in den Organen der Kürbiskeimlinge nachgewiesen, wobei in 3 Tage und 5 Tage alten Keimlingen die Expression der *CmGAIPa* relativ der *CmGAIPb* entspricht (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1). In 7 Tage alten Keimlingen liegen dagegen in der Wurzelspitze und der Kotyledone höhere Gehalte an *CmGAIPa* vor und deuten auf einen spezifischen Einfluss bei der Repression der Gibberellin-Antwort hin.

Neben den Repressoren sind die Gibberellin 2-Oxidasen während der Keimlingsentwicklung expremiert. Dabei zeigt besonders der Wurzelrest hohe Transkripte ab dem dritten Tag, wogegen in den anderen Geweben die Expression während der Entwicklung zunimmt (Abb. 4.2; Kap. 3.3.1). Die *CmGA2ox1* besitzt eine wurzelspezifische Expression (Lange et al., 2005), wogegen die *CmGA2ox3* neben dem Wurzelrest auch in den Sprossorganen von 7

Tage alten Keimlingen expremiert ist. Damit scheinen unterschiedliche Gibberellin 2-Oxidasen für die Deaktivierung in der Wurzel und dem Spross zuständig zu sein, wobei eine überlappende Funktion im Wurzelrest besteht. Die *CmGA2ox2* besitzt nur eine geringe Expression während der Keimlingsentwicklung, wobei die höchsten Transkriptgehalte im Wurzelrest bestimmt wurden. Die Deaktivierung des bioaktiven Gibberellins scheint besonders im Wurzelrest ein wichtiger Mechanismus zur Regulierung des endogenen Gibberellin-Gehalts während der Keimlingsentwicklung darzustellen.

4.4 Gibberellin-Signalwege während der Entwicklung männlicher Kürbisblüten

In den Organen männlicher Kürbisblüten wurden die Vorstufen sowie das bioaktive Gibberellin lokalisiert (Kap. 3.4; Knop, 2007). Dabei weisen die Stamina die höchsten Gehalte an endogenen Gibberellinen auf, welche während der Entwicklung der Blüte ansteigen. Im Gegensatz zu den höheren endogenen 7-oxidierten Gibberellinen in den Stamina wurden in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen ca. 10 – 20-fach höhere Transkriptgehalte der *CmGA7ox* ermittelt (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3). In diesen Organen könnte das GA₁₂ synthetisiert und anschließend in die Stamina transportiert werden, wodurch die geringen endogenen Gehalte in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen resultieren würden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Bildung direkt in den Stamina durch die Aktivität eines während der Blütenentwicklung nicht untersuchten Enzyms erfolgt. So wird in vielen Pflanzen das GA₁₂-Aldehyd durch die *ent*-Kaurensäure-Oxidase, eine NADPH-abhängige Cytochrom P450-Monooxygenase, 7-oxidiert (Helliwell et al., 2001a). Auch in Kürbissamen konnte eine Synthese des GA₁₂ durch mikrosomale Monooxygenasen beobachtet werden (Lange, 1997). Des Weiteren wurde in dem Genom der mit Kürbis nahe verwandten Art *Cucumis sativus* zwei Gibberellin 7-Oxidasen identifiziert (Huang et al., 2009). Die Synthese könnte somit in den Stamina durch eine mikrosomale Monooxygenase oder einer weiteren bisher nicht bekannten Gibberellin 7-Oxidase erfolgen.

Die Expression der *CmGA20ox3* und der *CmGA20ox4* wurde entsprechend zu den endogenen Gibberellinen in den Stamina der männlichen Blüten detektiert (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3, Kap. 3.4; Knop, 2007). Während der Entwicklung der Blütenknospe sinken die Transkriptgehalte, wobei die Expression der *CmGA20ox3* stärker ausgeprägt ist als die der *CmGA20ox4*.

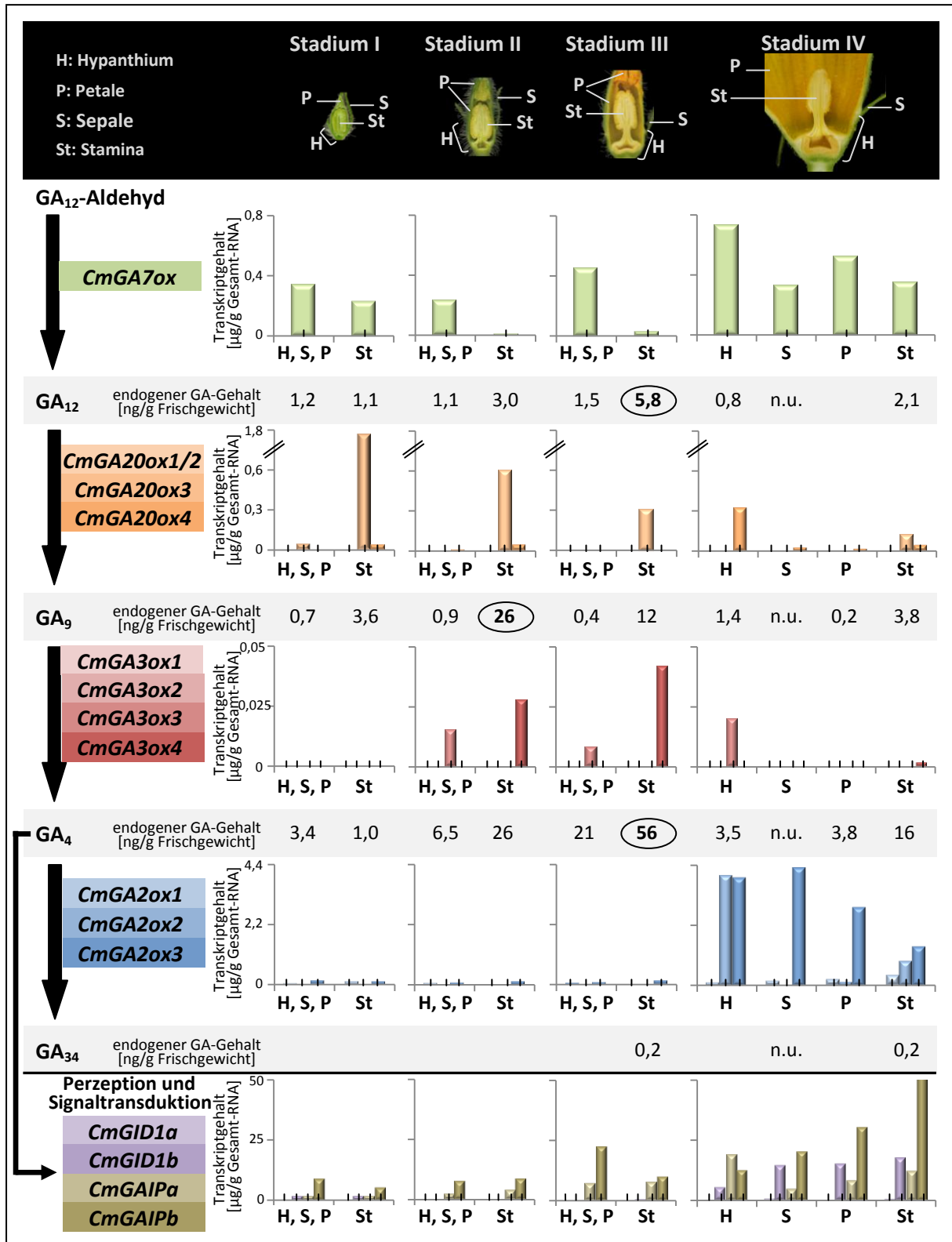


Abb. 4.3: Übersicht über die Gibberellin-Biosynthese in den Organen der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) des Stadiums I, II, III und IV; die Transkriptgehalte der *CmGA7ox*, *CmGA20ox3*, *CmGA20ox1* der Stadien I und IV sind Knop, 2007 und die der *CmGAIPa*, *CmGAIPb* sind Frenzel, 2009 entnommen; die anderen Transkriptgehalte der Gibberellin-Dioxygenasen sowie Gibberellin-Rezeptoren sind in dieser Arbeit im Kap. 3.3.3 und die endogenen Gibberellin-Gehalte im Kap. 3.4 dargestellt

Die im Samen expremierte *CmGA20ox1* wurde bisher lediglich in der jungen Blütenknospe untersucht, wobei die Knospe als Ganzes betrachtet wurde (Fischer, 2004). Es konnte dabei keine Expression dieses Gens ermittelt werden, wogegen Transkripte der *CmGA20ox3* auch bei Verwendung der gesamten Knospe detektiert wurden. Damit scheinen während der Blütenentwicklung die *CmGA20ox3* und die *CmGA20ox4*, jedoch nicht die *CmGA20ox1*, für die Synthese des GA_9 zuständig zu sein.

Von den vier bekannten Gibberellin 3-Oxidasen konnte lediglich eine Expression der *CmGA3ox3* und der *CmGA3ox4* während der Blütenentwicklung nachgewiesen werden (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3). Dabei kommen Transkripte der *CmGA3ox4* entsprechend der 3 β -hydroxylierten Gibberellinen in den Stamina vor, wogegen die *CmGA3ox3* in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen expremiert ist. Die Transkriptgehalte der *CmGA3ox3* sind im Vergleich zu den im Keimling ermittelten Gehalten sehr gering. Des Weiteren wurde in diesen Organen keine oder nur eine geringe Expression einer Gibberellin 20-Oxidase nachgewiesen, so dass nur eine geringe Synthese des bioaktiven Gibberellins erfolgen kann. So liegen in dem Hypanthium, den Sepalen und den Petalen geringe Gehalte 3 β -hydroxylierter Gibberelline vor (Abb. 4.3; Kap. 3.4; Knop, 2007).

Die Stamina weisen hohe Gehalte des bioaktiven Gibberellins auf, obwohl die *CmGA3ox4* vergleichbar schwach expremiert ist. Es wäre denkbar, dass die *CmGA3ox4*, wie für den Keimling vermutet wurde (Kap. 4.3), einer fluktuierenden Expression über den Tag-Nacht-Rhythmus unterliegt. Entsprechend zu der Ernte der Keimlinge wurden die Blüten immer 1 – 4 Stunden nach Beginn der Beleuchtung geerntet. Der regulatorische Einfluss des Tag-Nacht-Rhythmus auf die Expression der *CmGA3ox4* könnte somit einen allgemeinen Mechanismus während der Pflanzenentwicklung darstellen.

Die Expression der *CmGA3ox4* konnte im Gegensatz zu den Gibberellin 20-Oxidasen erst ab dem Stadium II nachgewiesen werden (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3; Knop, 2007). In den Stamina liegen entsprechend der Expression das Maximum des Endprodukts der Gibberellin 20-Oxidasen, GA_9 , im Stadium II und der Gibberellin 3-Oxidasen, physiologisch aktives GA_4 , im Stadium III vor (Abb. 4.3; Kap. 3.4).

Auch in anderen Pflanzen wurde die Gibberellin-Biosynthese in den Stamina lokalisiert. So sind die Gibberellin 20-Oxidasen in der Tomatenblüte entwicklungsspezifisch in den Antheren sowie der Plazenta expremiert (Rebers et al., 1999; Olimpieri et al., 2011). Die Gibberellin 3-Oxidasen wurden ebenfalls hauptsächlich in den reproduktiven Organen der Tomaten-, Arabidopsis- und Tabakblüte nachgewiesen. Dabei ist die *AtGA3ox1* in den Filamenten und die *AtGA3ox2*, *AtGA3ox3*, *AtGA3ox4* sowie die *Nty*, eine Gibberellin 3-Oxidase aus Tabak, in den Antheren lokalisiert (Itoh et al., 1999; Mitchum et al., 2006; Hu et al., 2008).

Neben der Lokalisierung der Gibberellin-Biosynthese in den Stamina wurde in vielen Pflanzen ein Einfluss des Gibberellins auf die Entwicklung der Blütenorgane und besonders auf die reproduktiven Organe beobachtet. So führen in *Arabidopsis* Mutationen der Gibberellin-Biosynthese-Gene sowie der Gibberellin-Rezeptor-Gene zu einer abweichenden Entwicklung der Blüten (Cheng et al., 2004; Yu et al., 2004; Griffiths et al., 2006; Rieu et al., 2008a). Dabei wurde neben dem reduzierten Wachstum der Blütenorgane ein Abbruch der Staminaentwicklung beobachtet, der zu verkürzten Filamenten durch eine Reduzierung der Zelllänge und zur Infertilität führt. Bei Applikation von exogenen bioaktiven Gibberellin bzw. bei einer zusätzlichen Mutation der für die Blütenentwicklung wichtigen Repressoren der Gibberellin-Antwort wurde eine zum Wildtyp entsprechende Entwicklung beobachtet (Koorneef & van der Veen, 1980; Cheng et al., 2004). Auch die *gib-1* Toamtenmutante weist einen Abbruch der Blütenentwicklung auf, welcher durch Behandlung mit bioaktiven Gibberellin aufhebbar ist (Jacobsen & Olszewski, 1991; van den Heuvel et al., 2001).

Dagegen konnte in GA-defizienten Kürbispflanzen lediglich ein signifikanter Unterschied in der Blütenstiellänge beobachtet werden, obwohl das vegetative Wachstum signifikant gehemmt war (Kap. 3.5). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass durch Entfernung der Stamina, in denen die höchsten endogenen Gehalte an physiologisch aktiven GA₄ vorliegen, neben der Blütenstielentwicklung auch die Entwicklung der anderen Kürbisblütenorgane abgebrochen wird (Pimenta Lange, Knop & Lange, eingereicht). Eine Applikation von bioaktiven GA₄ an der Stelle der entfernten Stamina führte dabei zu einer weiteren Entwicklung der Blütenorgane.

In männlichen Kürbisblüten ist somit Gibberellin wie bei *Arabidopsis* und Tomate für die Entwicklung der Blütenorgane essentiell. Dabei scheint, wie für *Arabidopsis* vermutet (Hu et al., 2008), das in den Stamina synthetisierte Gibberellin für die Entwicklung der anderen Organe verantwortlich zu sein und einem Transport aus den Stamina in die weiteren Blütenorgane zu unterliegen.

Die durch Behandlung mit LAB 150 978 resultierte Reduktion des GA₄-Gehalts scheint somit zur Änderung der Blütenentwicklung nicht ausreichend gewesen zu sein. Eine Analyse der endogenen Gibberelline in den Stamina der mit 10⁻⁴M LAB 150 978 behandelten Pflanzen zeigte, dass der Gehalt des bioaktiven GA₄ um ca. 85% reduziert war (Kap. 3.5). Die in den Blüten vorkommenden ca. 15% des normalen Gehalts an bioaktiven Gibberellin sind somit für eine zu der Kontrollpflanze entsprechende Entwicklung der Blütenorgane, mit Ausnahme des Blütenstiels, ausreichend.

Auch das Maximum des physiologisch aktiven Gibberellin A₄ sowie die Expression der für die Perzeption des Gibberellin-Signals benötigten Rezeptor-Gene deuten auf einen Einfluss von Gibberellin neben der Blütenorganentwicklung hin. So weist das Stadium III, 6 – 18 Stunden vor der Blütenöffnung und mit größtenteils abgeschlossenem Wachstum der Organe, den

höchsten Gehalt an physiologisch aktiven GA₄ und eine geringe Expression der beiden bekannten Gibberellin-Rezeptor-Gene in Kürbis auf (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3, Kap. 3.4). In der geöffneten Blüte dagegen wurden nur geringe endogene Gibberellin-Gehalte ermittelt, jedoch sind die Transkriptgehalte bis zu 150-fach für *CmGID1b* bzw. 5-fach für *CmGID1a* höher als im Stadium III (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3, Kap. 3.4). Gibberellin scheint somit einen Einfluss auf eine zwischen diesen Stadien vollzogene Entwicklung zu besitzen. So wurde in vielen Pflanzenarten ein Abbruch der Pollenentwicklung bei GA-Defizienz beobachtet (van den Heuvel et al., 2001; Izhaki et al., 2002; Cheng et al., 2004). Jedoch zeigten die Pollen der mit LAB 150 978 behandelten Pflanzen zumindest keine zur Kontrolle unterschiedliche Viabilität oder eine mit Lichtmikroskop sichtbare unterschiedliche Morphologie (Pimenta Lange, unveröffentlichte Daten).

Während der Blütenentwicklung sind die Gibberellin-Rezeptor-Gene gering expremiert (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3). Dabei weist *CmGID1b* während der Knospenbildung des Stadiums I eine zu in den Keimlingen vergleichbare Expression auf. Ab Stadium II sind geringere und zu *CmGID1a* vergleichbare Gehalte in den Organen vorhanden. Die höheren Transkriptgehalte im Stadium I könnten auf einen Einfluss des Gibberellins auf die frühe Differenzierung der Organe in der Blütenknospe hindeuten. So besitzt Gibberellin in vielen Pflanzen einen Einfluss auf die Geschlechtsentwicklung. Bei der mit Kürbis nahe verwandten Art *Cucumis sativus* konnte durch Applikation von Gibberellin eine Erhöhung des Verhältnisses von männlichen zu weiblichen Blüten beobachtet werden (Peterson & Anhder, 1960; Fuchs et al., 1977), wogegen die Behandlung mit (2-chloroethyl)-trimethylammonium chloride, einem Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese, zu einer Erniedrigung des Verhältnisses führte (Mishra & Pradhan, 1967). Die Behandlung mit 10⁻⁵M LAB 150 978 dagegen resultierte bei Kürbis in keiner Änderung des Blütengeschlechts (Knop, 2007). In der Pflanze *Momordica charantia* wurde beobachtet, dass lediglich bei hohen Konzentrationen des Hemmstoffes eine höhere Anzahl männlicher Blüten ausgebildet werden (Ghosh & Basu, 1982). Die Behandlung mit 10⁻⁴M LAB 150 978, und somit einer stärkeren Reduzierung des endogenen Gibberellin-Gehalts in der Kürbispflanze, blieb jedoch ohne Einfluss auf die Anzahl der männlichen und weiblichen Blüten (Kap. 3.5).

Des Weiteren wurde in Arabidopsis ein regulatorischer Einfluss von Gibberellin auf die Expression der Blütenorgan-Identitätsgene *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*), *AGAMOUS* (*AG*) beobachtet (Yu et al., 2004), die für die Ausbildung als auch das Wachstum der einzelnen Blütenorgane verantwortlich sind. Dagegen scheinen in Gurke zumindest die identifizierten *AG*-Homologe nicht durch Gibberellin reguliert zu sein (Perl-Treves et al., 1998). Entsprechend konnte bei den mit LAB 150 978 behandelten Pflanzen keine zu der Kontrolle abweichende Entstehung der Blütenorgane beobachtet werden.

Die drei bekannten Gibberellin 2-Oxidasen sind in den männlichen Blüten expremiert, wobei die Transkriptgehalte der *CmGA2ox1*, *CmGA2ox2* sowie *CmGA2ox3* während der Entwicklung ansteigen (Abb. 4.3; Kap. 3.3.3; Knop, 2007). Dabei weist im Stadium IV die *CmGA2ox3* besonders hohe Gehalte in dem Hypanthium, den Sepalen sowie den Petalen und die *CmGA2ox2* in dem Hypanthium auf. Damit scheint die Deaktivierung des bioaktiven Gibberellins in den Organen, in denen keine Gibberellin-Biosynthese nachgewiesen werden konnte, eine wichtige Rolle zu spielen.

Trotz der hohen Expression der Gibberellin 2-Oxidasen und den sinkenden endogenen Gehalten an physiologisch aktiven GA₄ wurden lediglich geringe Gehalte an endogenem GA₃₄ in den Blütenorganen des Stadiums IV quantifiziert (Abb. 4.3; Kap. 3.4). Die Charakterisierung der rekombinanten *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* lässt vermuten (Kap. 4.1, Kap. 3.2.3), dass das physiologisch aktive GA₄ über GA₃₄ zu GA₃₄-Katabolit und weiteren bisher unbekannten Gibberellin-Kataboliten katabolisiert wurde, die bei der Analyse der endogenen Gibberellinen nicht berücksichtigt wurden.

Auch die Expression der Repressoren der Gibberellin-Antwort steigen während der Blütenentwicklung an (Frenzel, 2009). So wurde entsprechend zu den Gibberellin 2-Oxidasen in den Stadien I, II und III geringere Gehalte als im Stadium IV ermittelt. Dabei ist *CmGAIPb* besonders in den Stamina des Stadiums IV expremiert. Damit erfolgt sowohl die Repression des GA-Signals als auch die Deaktivierung des bioaktiven Gibberellins in der geöffneten Blüte, wodurch der temporäre Einfluss des Gibberellins verdeutlicht wird. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass lediglich 2 DELLAs in Kürbis bekannt sind (Haywood et al., 2005), wogegen im Genom der mit Kürbis nahe verwandten Art *Cucumis sativus* 4 DELLAs identifiziert wurden (Huang et al., 2009). Auch in *Arabidopsis* sind weitere DELLAs vorhanden, wobei lediglich 3 für die Blütenentwicklung zuständig sind (Cheng et al., 2004).

4.5 Virus induziertes Gen-Silencing-System in Kürbis und Gurke

Die Etablierung eines Virus induzierten Gen-Silencing-Systems (VIGS-System) in Kürbis (*Cucurbita maxima* L.) und Gurke (*Cucumis sativus* L.) erfolgte durch Verwendung des binären Tobacco Rattle Virus-Systems (TRV-System), welches ein weites Wirtsspektrum aufweist (Unver & Budak, 2009). Dazu wurde ein Genfragment der Phytoene-Desaturase (PDS) verwendet, wodurch bei einem erfolgreichen Gen-Silencing des *PDS* der eintretende gebleichte Phänotyp als Marker diente (Kumagai et al., 1995).

Die Infizierung der Kürbispflanzen über die Kotyledonen, den Spross oder die Wurzel mit *CmPDS*-pYL156 führte jedoch zu keiner zu den Kontrollpflanzen veränderten Pigmentierung der Blätter, des Sprosses oder der Blüten (Kap. 3.6.1). So wurde weder mit der Agroinfiltration, mit dem Wachstum im Infiltrationsmedium noch mit der Sprossinjektion, die eine direkte und wiederholte Infizierung am Ort der Virenwirkung erlaubte, ein Gen-Silencing des *PDS* beobachtet.

Trotz der fehlenden Bleichung konnte die virale RNA und somit die Transformation der Pflanzen, die Transkription sowie die Verbreitung des Virus nachgewiesen werden (Kap. 3.6.1). Eine Aussage über die Effizienz, die Virenkonzentration oder die Bildung sowie Verbreitung des Silencing-Signals ist jedoch nicht möglich.

Bei der Analyse der viralen RNA wurden dabei 2 unterschiedliche Formen ermittelt, wovon eine geringfügig größer ist als der Vektor ohne Insert (Kap. 3.6.1). Dies deutet auf den teilweisen Verlust des Genfragments bei der Insertion der T-DNA oder der Bildung der Virenpartikel hin, wodurch das Gen-Silencing nicht oder nur ineffizient erfolgen konnte.

Eine direkte Infizierung mit in Tabakpflanzen gebildeten Virenpartikeln resultierte jedoch in keiner Bleichung der Kürbispflanzen und somit in keiner Erhöhung der Effizienz. Dagegen konnte in einigen Pflanzen, in denen die Transformation über Agrobakterien oder die Bildung der Virenpartikeln aus dem Vektor ineffizient ist, eine erhöhte Effizienz durch direkte Infizierung mit Virenpartikeln beobachtet werden (Lu et al., 2003; Brigneti et al., 2004).

Die Infizierung mit den in Tabak gebildeten Virenpartikeln resultierte in der mit Kürbis nahe verwandten Art *Cucumis sativus* in einer zu den Kontrollpflanzen abweichenden Pigmentierung der Blätter (Kap. 3.6.2). Der verwendete virale Vektor *CmPDS*-pYL156 sowie die aus den Tabakpflanzen extrahierten Viren führten somit zu einem Gen-Silencing des *PDS* in Gurke. Fehler bei der Erstellung des Konstrukts oder der durchgeführten Methoden zur Bildung, Extraktion sowie Reinfizierung der Virenpartikel können somit ausgeschlossen werden. Dabei wiesen lediglich die ältesten Blätter einige gebleichte Bereiche auf, obwohl die Verbreitung des Virus bis in die jungen Blätter nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.6.2). Das für die Erstellung des Vektors verwendete Fragment des *CmPDS* weist zwar eine 86% Identität zu dem *CsPDS* (Cucumber Genome Database: Csa002881) auf, jedoch sind nur wenige längere Bereiche mit 100% Sequenzhomologie vorhanden. Durch Infizierung der Gurkenpflanzen mit einem in den pYL156 integrierten Fragment des *CsPDS* sowie durch Modifizierung der Wachstumsbedingungen könnte die Effizienz des Gen-Silencing erhöht und eine uniforme Bleichung der Pflanzen erzielt werden.

So wurde bei Verwendung eines auf dem Apple Latent Spherical Virus (ALSV) basierenden VIGS-Systems eine vollständige Bleichung der Blätter und des Sprosses der mit *CIPDS*-pEALSR2L5R5 (*PDS* von *Citrullus lanatus*, 98%ige Identität zu *CsPDS*) infizierten Gurkenpflanzen beobachtet (Igarashi et al., 2009). Auch bei weiteren Mitgliedern der Familie

Cucurbitaceae konnte ein Gen-Silencing des *PDS* mit diesem System erreicht werden, jedoch nicht bei der in dieser Arbeit verwendeten Kürbisart (Igarashi et al., 2009, pers. Kommunikation).

Cucurbita maxima scheint somit im Gegensatz zu vielen Mitgliedern der Familie *Cucurbitaceae* eine Resistenz gegen die bisher bei den VIGS-Systemen verwendeten Viren zu besitzen, die auf eine ineffiziente Virenbildung oder Virenverbreitung zurückzuführen ist.

Das TRV-System zeigt somit lediglich Potential zur Untersuchung der Genfunktion in Gurke.

Das bereits etablierte ALSV-System kann für eine direkte Infizierung der zu untersuchenden Pflanzen nicht verwendet werden, sondern erfordert die vorherige Infizierung der Pflanze Quinoa (*Chenopodium quinoa* L.). Dazu werden die viralen Vektoren in Quinoa injiziert, die Viren extrahiert und zur Vervielfältigung erneut in Quinoa injiziert, bevor eine Infizierung der Gurke erfolgen kann. Die Virenbildung sowie Vervielfältigung benötigt jeweils 10 – 20 Tage.

Das TRV-System bietet somit eine schnelle Alternative, die lediglich die viertägige Bildung der Virenpartikel in Tabak benötigt, wobei eine effiziente Infizierung durch direkte Injektion der viralen Vektoren nicht ausgeschlossen ist.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei bisher unbekannte Gibberellin-Dioxygenasen (*CmGA20ox4*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox3*) sowie die vollständig prozessierte Form der *CmGA2ox2* in der Wurzelspitze 7 Tage alter Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima* L.) identifiziert werden. Die neu identifizierten Gibberellin-Dioxygenasen besitzen dabei eine für die jeweilige Multigenfamilie charakteristische enzymatische Aktivität und sind neben anderen Gibberellin-Signalweg-Genen in Keimlingen und männlichen Blüten der monözischen Art *Cucurbita maxima* expremiert.

In Kürbiskeimlingen weisen die *CmGA20ox4* und die *CmGA3ox4* eine auf die Wurzel beschränkte Transkription auf, wobei die Transkriptgehalte für die *CmGA20ox4* nach 3 Tagen und für die *CmGA3ox4* während der gesamten Keimlingsentwicklung sehr gering sind. Nach Behandlung mit LAB 150 978, einem Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese, besitzen lediglich die Wurzelorgane eine erhöhte Expression, was trotz der geringen Gehalte eine Funktion dieser Gibberellin-Dioxygenasen in der Wurzel impliziert.

Transkripte der für die Gibberellin-Rezeptoren kodierenden Gene liegen dagegen neben den Wurzelorganen auch in dem Hypokotyl und der Sprossspitze vor. Dieses Expressionsmuster deckt sich dabei mit den durch Hemmstoffversuchen ermittelten Orten der Gibberellin-Wirkung in Kürbiskeimlingen. Die für die Repressoren der Gibberellin-Wirkung kodierenden Gene sind während der Entwicklung relativ konstant expremiert, wogegen die Expression der zur Deaktivierung des GA₄ beteiligten Gens *CmGA2ox3* während der Keimlingsentwicklung ansteigt und hohe Gehalte in dem Wurzelrest, der Kotyledone und der Sprossspitze zeigt. Dagegen besitzt die *CmGA2ox2* lediglich geringe Gehalte während der Keimlingsentwicklung und somit eine untergeordnete Rolle bei der Deaktivierung des physiologisch aktiven Gibberellins. So konnte auch durch Behandlung mit GA₄ bzw. LAB 150 978 nachgewiesen werden, dass sowohl die *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4* und *CmGA2ox3* jedoch nicht die *CmGA2ox2* an der Gibberellin-Homöostase in Kürbiskeimlingen beteiligt ist. Dabei wurden zusätzlich höhere Transkriptgehalte des *CmGID1b* in GA-defizienten Keimlingen nachgewiesen, wogegen die Expression der *CmGID1a*, der *CmGAIPa* und der *CmGAIPb* keine Regulation durch den endogenen Gibberellin-Gehalt aufweist.

In der männlichen Kürbisblüte konnten entsprechend zu den endogenen Gibberellinen die Expression der *CmGA20ox3*, *CmGA20ox4* und *CmGA3ox4* in den Stamina nachgewiesen werden, wobei die Expression der Gibberellin 20-Oxidasen ab dem Stadium I und der *CmGA3ox4* erst ab Stadium II beginnt. Die drei bekannten Gibberellin 2-Oxidasen sind dagegen in den jungen und mittleren Stadien gering und in der geöffneten Blüte hoch

expremiert und lassen auf einen temporären Einfluss des physiologisch aktiven Gibberellins, welches ein Maximum vor der Blütenöffnung besitzt, schließen.

Zur Ermittlung des Einflusses von Gibberellin auf die Blütenentwicklung wurden die Kürbispflanzen mit einem Hemmstoff der Gibberellin-Biosynthese behandelt. Bei den Pflanzen konnte dabei keine abweichende Geschlechtsbildung, Anzahl der Blüten, zeitliche Entwicklung der Blüten sowie Blütenorganentwicklung beobachtet werden. Lediglich die Blütenstiele zeigten eine signifikante Reduzierung der Länge, obwohl das vegetative Wachstum deutlich gehemmt war. Das Maximum des physiologisch aktiven Gibberellins vor der Blütenöffnung sowie das Expressionsmuster der Gibberellin-Rezeptor-Gene deuten auf einen Einfluss des Gibberellins auf die bereits entwickelten Blüten hin. So sind *CmGID1a* und *CmGID1b* während der Blütenknospenbildung konstant und relativ gering expremiert, wogegen in der geöffneten Blüte sehr hohe Transkriptgehalte ermittelt wurden. Jedoch wurde bei dem Hemmstoffversuch weder eine abweichende Entwicklung der Pollen noch der Blütenöffnung beobachtet.

Zur Untersuchung der Funktion der Mitglieder der an den Gibberellin-Signalwegen beteiligten Multigenfamilien während der Keimlings- und Blütenentwicklung sollte ein auf den Tobacco Rattle Virus (TRV) basierendes Virus induziertes Gen-Silencing-System (VIGS-System) etabliert werden. Obwohl die Bildung sowie Verbreitung der viralen RNA in der Kürbispflanze nachgewiesen werden konnte, führte die Infizierung der Kürbiskeimlinge durch die unterschiedlichen Infizierungsmethoden zu keiner durch das Gen-Silencing des *CmPDS* hervorgerufenen Weißfärbung der Pflanzen. Dagegen konnte mit dem TRV-System, den verwendeten Vektoren sowie der aus Tabakpflanzen extrahierten Virenpartikeln ein Gen-Silencing des *CsPDS* in der mit Kürbis nahe verwandten Gurke (*Cucumis sativus* L.) erzielt werden. Damit bietet das erstellte TRV-System lediglich Potential zur Untersuchung der Genfunktion in Gurke jedoch nicht in Kürbis.

6 Anhang

6.1 verwendete Primer und Temperaturprogramme der PCR

Tab. 6.1: Sequenzen und Schmelztemperaturen der degenerierten Primer für das PCR basierte `Screening` nach unbekannten Gibberellin-Dioxygenasen in Kürbis; D: A/T/G, H:A/C/T, N: A/C/G/T, R: A/G, S: C/G, V: A/C/G, W: A/T, Y: C/T

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]
Gibberellin 20-Oxidase	Forward	AAN YTN CCN TGG AAN GAR AC	56
	Reverse	TNA RNG TRT CNC CNA YRT T	53
Gibberellin 20/2-Oxidase	Forward	RTN RYN AAY CAY GGN GT	50
	Reverse	CAN RRN GGR TAR WDR TT	47
Gibberellin 3-Oxidase	Forward	ATG TGG HVN GAR DSN TTY AC	57
	Reverse	GTR TGN GSN SCN ARN CCC AT	63

Tab. 6.2: Sequenzen und Schmelztemperaturen der genspezifischen Primer zur Amplifizierung der 5'-Bereiche und der 3'-Bereiche der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4* und *CmGA2ox3*

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]
<i>CmGA20ox4</i>	5'RACE g.s. outer	GCC ATG AAA GTG TCA CCG AT	58
	5'RACE g.s. inner	CGT ACA CTT GAA GGC CAC TG	60
	3'RACE g.s. outer	GGA AGG TGT ATG AGG AGT GT	58
	3'RACE g.s. inner	CGA TCC CAC CTC CAT AAC CA	60
<i>CmGA3ox4</i>	5'RACE g.s. outer	AAT TGC AAG GCG GTG CTG CA	60
	5'RACE g.s. inner	CCA TTA CAT CGC AGA ACG GT	58
	3'RACE g.s. outer	GAC GAC GCC GAA ATC TCG AA	60
	3'RACE g.s. inner	CCG CCT TGC AAT TAA ACT GC	58
<i>CmGA2ox3</i>	5'RACE g.s. outer	CCT TCA ACA GCC TAC TCA AT	56
	5'RACE g.s. inner	CCC GCA AAA TGA AGA GGG AT	58
	3'RACE g.s. outer	CCT CAT CGG CGA CCT TGA AG	63
	3'RACE g.s. inner	CGG CGA TGT GGG TTG GAT TG	63

Tab. 6.3: Sequenzen und Schmelztemperaturen der Primer zur Amplifizierung des kodierenden Bereichs der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* (pBluescript II SK)

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]	Restriktions- schnittstelle
<i>CmGA20ox4</i>	Forward	NNN- CTGCAG -GCA ATG GCG ATC AAA TGC	71	<i>Pst</i>I
	Reverse	NNN- TCTAGA -AGG GTG GGT TTA AAG AGA GG	70	<i>Xba</i>I
<i>CmGA3ox4</i>	Forward	NN- AAGCTT -TAA TGA CCA CTC TCT CTC A	67	<i>Hind</i>III
	Reverse	CCG- TCTAGA -TTA TAT TTC GAT CAT AGA GAG	67	<i>Xba</i>I
<i>CmGA2ox2</i>	Forward	NNN- GTCGAC -ATG GTT GTT CTA TCT CAG C	69	<i>Hinc</i>II
	Reverse	NNN- GGATCC -TTA AAA CGT AGA CTT TTG AC	67	<i>Bam</i>HI
<i>CmGA2ox3</i>	Forward	NNN- CTGCAG -ATG GTG GTT CAA TCT CAA CT	70	<i>Pst</i>I
	Reverse	NNN- TCTAGA -TCA GGT CAA CAA AGG TGT GAG	70	<i>Xba</i>I

Tab. 6.4: Sequenzen und Schmelztemperaturen der Primer zur Amplifizierung des kodierenden Bereichs der *CmGA20ox4*, *CmGA3ox4*, *CmGA2ox2* und *CmGA2ox3* (pUC18)

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]	Restriktions- schnittstelle
<i>CmGA20ox4</i>	Forward	NNN- TCTAGA -G GCA ATG GCG ATC AAA TGC	69	<i>Xba</i>I
	Reverse	NNN- TCTAGA -AGG GTG GGT TTA AAG AGA GG	70	<i>Xba</i>I
<i>CmGA3ox4</i>	Forward	NNN- TCTAGA -G ATA ATG ACC ACT CTC TCT CA	69	<i>Xba</i>I
	Reverse	CCG- TCTAGA -TTA TAT TTC GAT CAT AGA GAG	67	<i>Xba</i>I
<i>CmGA2ox2</i>	Forward	NNN- GGATCC -T ATG GTT GTT CTA TCT CAG C	70	<i>Bam</i>HI
	Reverse	NNN- GGATCC -TTA AAA CGT AGA CTT TTG AC	67	<i>Bam</i>HI
<i>CmGA2ox3</i>	Forward	NNN- TCTAGA -G ATG GTG GTT CAA TCT CAA CT	69	<i>Xba</i>I
	Reverse	NNN- TCTAGA -TCA GGT CAA CAA AGG TGT GAG	70	<i>Xba</i>I

Tab. 6.5: Sequenzen und Schmelztemperaturen der zur Herstellung der Standards verwendeten Primer

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]	Restriktions- schnittstelle
<i>CmGA3ox3</i>	Forward	NN- GGATCC -CGA CTC TCG GTG GCT TAC GT	75	<i>Bam</i>HI
<i>CmGA2ox2</i>	Reverse	NNN- CTGCAG -CCA CTA ACA GCT TGC ATT TC	71	<i>Pst</i>I
<i>CmGA2ox3</i>	Forward	NNN- GGATCC - CCA ATA ACA CCG CCG GAC TC	75	<i>Bam</i>HI
	Reverse	NNN- GGATCC -CGC TTT TCT CTA TCC TCA AG	71	<i>Bam</i>HI
<i>CmGID1a</i>	Forward-1	N- GGATCC -CAT GAT GGC TGG AAG TAA TCG	71	<i>Bam</i>HI
	Forward-2	NNN- CTGCAG -GTT TGG AGG GCA GGA AAG	72	<i>Pst</i>I
	Reverse-1	N- GAGCTC - CCT GCA GAT AAT GCA AAC TC	69	<i>Sac</i>I
	Reverse-2	NNN- CTGCAG - GCA CAA GGA TAA CGA TTC TC	71	<i>Pst</i>I

Tab. 6.6: Sequenzen und Schmelztemperaturen der bei der kompetitiven RT-PCR verwendeten RT-, Forward- und Reverse-Primer

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]
CmGA7ox	RT	ATT TCA TAA TGT TTG ATG C	46
	Forward	TGG CTA ACA CAG GCA TCC CTA CTG TGG ACG	71
	Reverse	TCT CAT CCT CCA CTC TTG AAG GTG GAT GGG	70
CmGA20ox3	RT	GAA ACG ATT TTC CTC	42
	Forward	CAT GCA TGT CGT GAC ACT CAC G	59
	Reverse	TTT TCC TCA GGC GAG GAA AAG TG	58
CmGA20ox4	RT	GGG TTT AAA GAG AGG	43
	Forward	GAC AGC CAA ATC ACA AGG AG	58
	Reverse	GTT GAA GCC AAG TTG TGA AG	56
CmGA3ox1	RT	TTG TTA GGG CAG CA	43
	Forward	ACA AAA CGG TCT CGA TCC CGG TTG TCG	68
	Reverse	CCC TTC CCC GAG GCT TTA GCC TTG ATG	70
CmGA3ox2	RT	GTA GTA CAC GAA CAG TT	48
	Forward	TCT CCA AGT ACT CCC CGA CTC CTA CCA GTG	71
	Reverse	GGA TAA AGT CAG TCC AAG ATA TGG GGC GGT	68
CmGA3ox3	RT	GTC AGC CAA AAT AG	40
	Forward	GCT TCT ACT ACT AAC CCA TTT	57
	Reverse	TTG ACT GTG TTT TAG GGT GG	55
CmGA3ox4	RT	CCA GAT TCT TCG CTT	43
	Forward	CCA CCC TCT TAT TCA CCT TC	58
	Reverse	CCG ACA TAC TCC TTC ACC AC	60
CmGA2ox1	RT	AGA TGT TCG AAT CC	40
	Forward	AAT GAG AAG CTC CAC GTC CAT G	60
	Reverse	GAT GTT CGA ATC CTG TCA CCT C	60
CmGA2ox2	RT	CGT AGA CTT TTG ACT	41
	Forward	GCC AGC GTT GGA TTT GGA GA	60
	Reverse	GAG CCT GTA ATC AGC CAA TC	58
CmGA2ox3	RT	GGT GTG AGA GTT TTG	43
	Forward	GTA AAC GCA CCG CTC TGT TC	60
	Reverse	GGG CCT AAC CTA CAA TCA GC	60
CmGID1a	RT	CTG CAG ATA ATG CA	41
	Forward	CAT GAT GGC TGG AAG TAA TCG	58
	Reverse	GTC AGA ACT CAC GAA TTC AC	55
CmGID1b	RT	GGT TGA TAA AGT TGT C	44
	Forward	GGA GAT CAC TGG CTG TGT TC	59
	Reverse	GTT TCA CGT CGT GAC CGG AG	61
CmGAIPa	RT	CAA ACT AAG ACG AAG	41
	Forward	CCA CCG TCT AAA CCC AAC CCT	63
	Reverse	GGC CAC ATT TGC GAG TGG TGG	59
CmGAIPb	RT	GAA AGG CAC ATT TG	38
	Forward	GTT TTC CGC AGC CGC ATC C	62
	Reverse	GGA AAA ACC CAG CCC AAT TTG G	62

Tab. 6.7: Übersicht über die verwendete Annealingtemperatur und Elongationszeit bei dem PCR-Schritt der kompetitiven RT-PCR

Gen	Annealingschritt	Elongationsschritt
<i>CmGA7ox</i>	30 sec, 72°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA20ox3</i>	30 sec, 60°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA20ox4</i>	30 sec, 60°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA3ox1</i>	30 sec, 72°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA3ox2</i>	30 sec, 72°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA3ox3</i>	30 sec, 60°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA3ox4</i>	30 sec, 60°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA2ox1</i>	30 sec, 60°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA2ox2</i>	30 sec, 64°C	90 sec, 72°C
<i>CmGA2ox3</i>	30 sec, 62°C	90 sec, 72°C
<i>CmGID1a</i>	30 sec, 56°C	70 sec, 72°C
<i>CmGID1b</i>	30 sec, 60°C	60 sec, 72°C
<i>CmGAIPa</i>	30 sec, 58°C	120 sec, 72°C
<i>CmGAIPb</i>	30 sec, 62°C	90 sec, 72°C

Tab. 6.8: Sequenzen und Schmelztemperaturen der degenerierten Primer für das PCR basierte `Screening` nach *CmPDS*; B: C/G/T, H: A/C/T, K: G/T, N: A/C/G/T, R: A/G, Y: C/T

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]	Restriktions- schnittstelle
<i>CmPDS</i>	Forward-1	N-TCTAGA-GCN YTN AAY TTY ATH AAY CC	63	<i>XbaI</i>
	Reverse-1	N-GGATCC-YKB ARY TTY CKR TCR AAC C	68	<i>BamHI</i>

Tab. 6.9: Sequenzen und Schmelztemperaturen der Primer zum Nachweis viraler RNA und endogener Transkripte des *PDS*; B: C/G/T, H: A/C/T, K: G/T, R: A/G, Y: C/T

Gen	Primer	Sequenz (5' - 3')	T _m [°C]	Restriktions- schnittstelle
<i>pYL156</i>	Forward	CTC AAG GAA GCA CGA TGA GC	60	/
	Reverse	CAG TCG AGA ATG TCA ATC TCG	59	/
<i>CmPDS</i>	Forward-2	CAG AAC YTG TTT GGR GAR C	56	/
	Reverse-2	NN-GGATCC-TCT CAT CCA BTC YTK HCA	68	<i>BamHI</i>

6.2 Gelbilder der Klonierung der neuen Gibberellin-Dioxygenasen

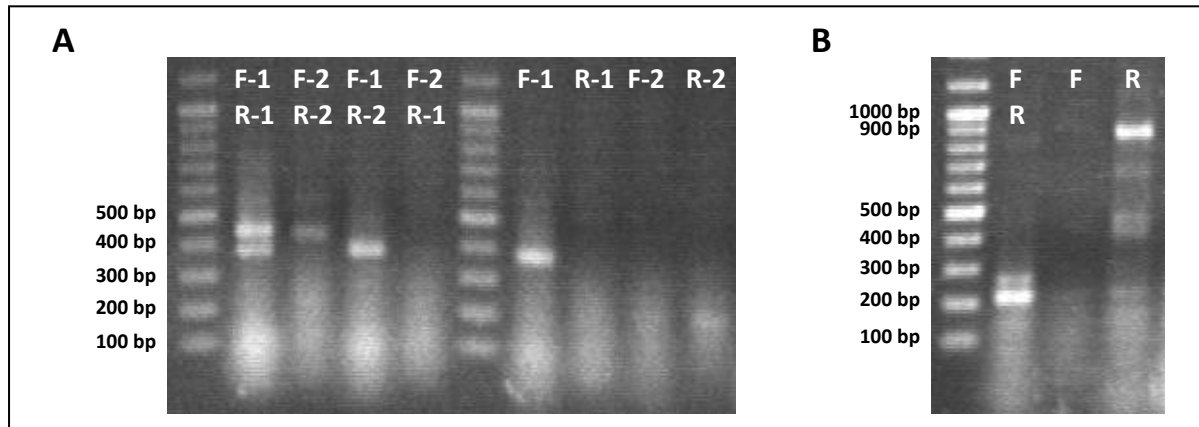


Abb. 6.1: Amplifizierte Fragmente mit den heterologen degenerierten Primern für eine Gibberellin 20-Oxidase (A) und für eine Gibberellin 3-Oxidase (B) bei Verwendung von Wurzelspitzen-cDNA 7 d alter Kürbiskeimlinge; F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer

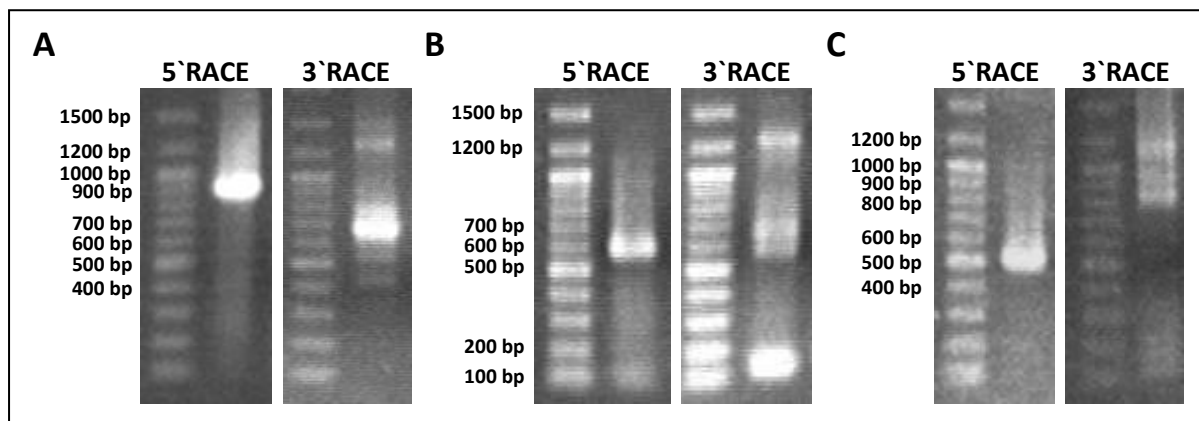


Abb. 6.2: Amplifizierte 5'- und 3'-Bereiche der *CmGA20ox4* (A), der *CmGA3ox4* (B) und der *CmGA2ox3* (C) bei Verwendung von Wurzelspitzen-cDNA 7 d alter Kürbiskeimlinge

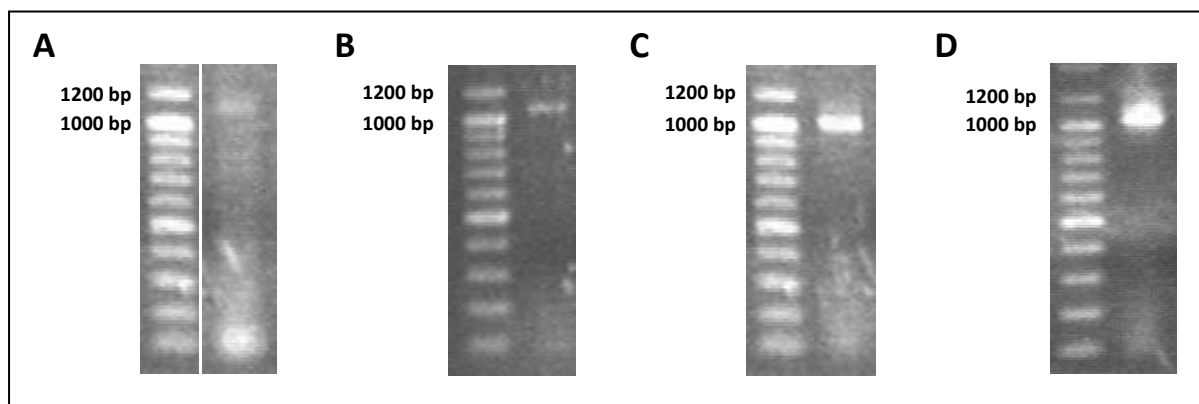


Abb. 6.3: Amplifizierte kodierende Bereiche der *CmGA20ox4* (A), der *CmGA3ox4* (B), der *CmGA2ox2* (C) und der *CmGA2ox3* (D) bei Verwendung von Wurzelspitzen-cDNA 7 d alter Kürbiskeimlinge

6.3 Nukleotidsäure- und Aminosäuresequenzen

CmGA20ox4 (GenBank: FN808418)

Start- und Stoppcodon sind unterstrichen

```

1  aagattcaaa  ttcttcacat  cagaacaaga  atagtctatt  agttatttca  ttttcttaaa
61  tctgttttggg  tgcattgcaat  ggcatcaaaa  tgcattgacga  cagccaaatc  acaaggagaa
121 tcaaaactga  agcaagagat  gaagaggaag  caccgtgttg  aatttgggtc  ctccgatgag
181 tcaatggtgc  cggagaattt  catatggccg  gacgagttta  aggcaaggga  gtcggtaccg
241 gagctggatg  ttccacatat  tgacttgacg  aagtttgtga  gtgaaaatga  gaatgacatt
301 gaagaggcaa  cgaggctggg  ggatgaggct  tgcagaaagc  atggattcct  tgtgttggtc
361 aacctgggag  tagacatgga  attgatgaaa  aacgttcatt  aatgtatgga  tgagttcttc
421 tcattgcctt  tggatgtgaa  gcaaaaggct  caaaggaagg  tgggtgaaaa  ttatgggtat
481 gccaatagct  tcattgggag  attctcctcc  aagcttccat  ggaaggaaac  atttagccta
541 cgctatgctg  ctcatcacia  cttgcccggt  acccagcact  atgtttgcca  ccatttgggc
601 ccagaattct  cccaacaagg  gaaggtgtat  gaggagtgtg  gagaagcgct  gagcgatctg
661 agtttgaaga  tagtggagct  tttgggggtg  agccttggcg  tcccaaaaga  gaaattcaag
721 aaattctttg  aagacaacga  ttcaataata  aggtttaatt  attaccacc  atgcaataag
781 ccagagctga  ccttaggaac  tggccctcat  tgcgatccca  cctccataac  cattcttcac
841 caagatcacg  tcagtggcct  tcaagtgtac  gtggatgatc  agtggcactc  aattcctcca
901 atcaaggact  cctttgtcat  caacatcggt  gacactttca  tggctctcac  aaatgggggt
961 tacaagagct  gcttccaccg  ggcggtagtg  aactgccggg  aagcaagaaa  atcaatcggt
1021 ttcttcctat  gtccggcgga  tgacaaagtg  gtgagagcac  cggacgagat  cgtggacaag
1081 aatccgccac  gaaagtttcc  agattacaca  tggccaatgc  tgcttgagct  gacccaaaag
1141 ttttataggt  cggattcaaa  cactttcaag  gccttcacia  cttggcttca  acacaaaaac
1201 ttggccaccg  ctgcttcctc  tctggccccc  tctctttaaa  cccaccctca  tttctaattc
1261 gtgtgtttat  gccaaataaa  ggtagtgttt  ttaggaggtt  tggcctgtat  gtgtttgttt
1321 tttgtggtgt  tggacgttac  aggaaggttt  gtcccatcct  tgtcatgtgc  atgttccgag
1381 actccaccat  ttattttaa  caaattcaat  gagtttcaaa  aaaaaaaaaa

```

```

1  MAIKCMTTAK  SQGESKLLKQE  MKRKHRVEFG  SSDESMVPEN  FIWPDEFKAR  ESVPELDVPH
61  IDLQKFVSEN  ENDIEEATRL  VDEACRKHGF  FVLVNHGVDM  ELMKNVHECM  DEFFSLPLDV
121 KQKAQRKVGE  NYGYANSFIG  RFSSKLPWKE  TFSRLRYAAH  NLPVTHDYVC  HHLGPEFSQQ
181 GKVEECGEA  LSDLSLKIVE  LLGLSLGVPK  EKFKKFFEDN  DSIIRLNYYF  PCNKPELTG
241 TGPCHDPTSI  TILHQDHVSG  LQVYVDDQWH  SIPPIKDSFV  INIGDTFMAL  TNGVYKSCFH
301 RAVVNCREAR  KSIVFFLCPA  DDKVVRAPDE  IVDKNPPRKF  PDYTWPMLE  LTQKFYRSDS
361 NTFKAFTTTL  QHKNLATAAS  SLAPSL*

```

CmGA3ox4 (GenBank: FN808419)

Start- und Stoppcodon sind unterstrichen

```

1   aaaaaaaciaa  acaaaccat  ttctttgctt  tgccaatcca  tcaacataat gaccactctc
61  tctcaagcat  atagagacca  ccctcttatt  caccttcacc  atatcgtecc  tttggacttc
121 gattcattac  gaaccgtccc  tgactctcac  gattggcctc  attcttcgta  tgataccctt
181 aaacttcata  ctaatggaga  tgtttcgatt  cccttgatcg  atatgtctga  ccctaattga
241 gcgatgctca  ttggtaatgt  atgtaagaca  tggggagtg  tccaattgac  caaccatggc
301 gtgccaacga  gtctggtgga  gagagctgaa  gctgaggcgg  gacgactatt  cgatcttcca
361 atgacacgaa  aactaaaggc  gcttcgagct  cccggcgacg  ccaccggcta  cggcttgctc
421 cgaataacgc  cttttttctc  taagtatatg  tggcatgagg  gatttactat  tatgggatcc
481 tccgcagaac  atgcttctca  actttggtct  tctaactacc  aaccgttctg  cgatgtaattg
541 gaagagtacc  agaagaacat  gaagtcctta  gctgagaaaa  tcacacattt  aatcttaaata
601 ttccttaaaa  tccccgacga  cgccgaaatc  tcgaactggc  tccattccgc  cggagccgcc
661 gccgcctgca  gcaccgcctt  gcaattaaac  tgctaccccc  ggtgcccgga  tccaaccggg
721 gtcattgggtc  tggcccccaca  taccgacacc  tttctattga  caatcctcca  ccaaagcagc
781 acgtgcgggc  tccaaatctt  cagggacggg  ttccggtgga  tacctgtgac  gccggtagcc
841 ggtgcactag  tcctcaacgt  cgccgacctg  ttccacatcc  tgtcgaatgg  gcggttcccg
901 aatgtcctcc  accgggttgt  cgtcgacctg  acccgacgcc  gcctgtctat  ggcgtatttc
961 tttggaccac  cgccggattt  ctgctgacg  ccgtttaaca  atccaccgga  atctccccgg
1021 ttcgggtctg  tgggtggtgaa  ggagtatgtc  ggggtgaaag  cgaagaatct  ggagtgtgcc
1081 ctctctatga  tcgaaatata aataataata  taataattat  tattattgaa  ttttgtatca
1141 taattatata  tttgttttag  ttaatatattc  aatttttgta  atctttccct  ttccaccatc
1201 tccatttcca  tttctaccgg  taataatagg  ttcaagttca  ctataataat  aaaaaccaat
1261 atatatatcc  aaaaaaaaaa  aaa

```

```

1   MTTLSQAYRD  HPLIHLHHIV  PLDFDSLRTV  PDSHDWPHSS  YDTLKLHTNG  DVSIPLIDMS
61  DPNVAMLIGN  VCKTWGVFQL  TNHGVPTSLV  ERAEAEAGRL  FDLPMTRKLK  ALRAPGDATG
121 YGLPRITPFF  SKYMWHEGFT  IMGSSAEHAS  QLWSSNYQPF  CDVMEEYQKN  MKSLAEKITH
181 LILNFLKIPD  DAEISNLHLS  AGAAAACSTA  LQLNCYPRCP  DPTRVMGLAP  HTDTFLLTIL
241 HQSSTCGLQI  FRDGFGWIPV  TPVAGALVLN  VGDLFHILSN  GRFPNVLHRV  VVDPTRRRRLS
301 MAYFFGPPPD  FCVTPFNNPP  ESPRFRSVVV  KEYVGLKAKN  LECALSMIEI  *

```

CmGA2ox2 (GenBank: FN808420)

Start- und Stoppcodon sind unterstrichen

```

1  atggttggttc  tatctcagcc  agcgttggat  ttggagaaat  attctcttct  ccgatcaacg
61  ggcaaaccgc  cgcctccgc  agccgatatt  cgggaaattg  acctttcaga  ccccaacgct
121 aagtcccacg  tcgtcaaagc  ctgcgaagaa  ttcgggttct  tcaagctggt  aaaccaccgg
181 gttcccgtcg  agttgatgac  caaactcgaa  gatgaatccc  tctgtttttt  caagctttct
241 cagtccgaga  aagataaagc  tcgcccgcct  gaccctttgg  gctatggctc  caaaaatatc
301 ggctctaata  gcgataaggg  ctggatcgaa  tatctccttc  tcaacgctaa  tcctctcccc
361 cttttctccc  aacagtccga  ttctttcctc  tcggcgggcg  cggagtatgt  gacggcgggtg
421 aagaaattga  gcggcgaagt  ggtggaatta  ataacagaag  gattaaaaat  cgagccaaaa
481 aatgcgataa  gcaggcttat  aaacgacgag  aaagctgatt  gttatttcag  agtgaaccat
541 taccgcgcat  gtccggaaat  gcaagctggt  agtggacgaa  acatgatcgg  attcggggaa
601 catacagacc  cacaaatcat  atcactgtta  agatcaaaca  actcaaccgg  cttgcaaatac
661 tgccggagag  acggcgtgtg  ggtctcagtg  ccgccagata  cgacggcggt  ctttgtcaat
721 gtcggcgatg  cgctgcaggt  gatgaccaac  gggagattca  aaagcgtgaa  gcacaaagtg
781 gtggcggtat  ccagcaaaga  gagggtttcg  atgatttact  ttggggggcc  gccgttgagt
841 gaaaagattc  agccattgtc  gcaggtttta  gcagaggggg  aagaaagctt  gtacaaggaa
901 ttcacctggg  ggggaatacaa  aacggcgggc  tttaagacca  gattggctga  ttacaggctc
961 ggtgcgtttg  aaaagagtca  aaagtctacg  ttttaa

```

```

1  MVVLSQPALD  LEKYSLLRST  GKPAASAADI  PEIDLSDPNA  KSHVVKACEE  FGFFKLVNHR
61  VPVELMTKLE  DESLCFFKLS  QSEKDKARPP  DPLGYGSKNI  GSNGDKGWIE  YLLLNANPLP
121 LFSQQSDSFL  SAAAEYVTAV  KKLSGEVVVEL  ITEGLKIEPK  NAISRLINDE  KADCYFRVNH
181 YPPCPEMQAV  SGRNMIGFGE  HTDPQIIISLL  RSNNSTGLQI  CRRDGVWVSV  PPDTTAFFVN
241 VGDALQVMTN  GRFKSVKHKV  VADSSKERSV  MIYFGGPPLS  EKIQPLSQVL  AEGEESLYKE
301 FTWWEYKTAA  FKTRLADYRL  GAFEKSQKST  F*

```

CmGA2ox3 (GenBank: FN808421)

Start- und Stoppcodon sind unterstrichen

```

1  aaaatccact  tgacttccat  ttcttcttct  ttcctctggt  ttcaaagcct  tcttctttgt
61  tcaaccatgg  tggttcaatc  tcaactcgtg  tttgaccatt  ttgctccgat  taagtccgtg
121 aaacgcaccg  ctctgttcac  tggaattccg  gtgatcgacc  ttaaagaccc  agaagcaaaa
181 acccagatcg  tcaaagcttg  cgaggatttc  ggattcttta  aggtcatcaa  ccatggcgtg
241 tccgatcacc  tcatcggcga  ccttgaagcc  caagctttga  aattctttca  actccctcaa
301 tcggagaagg  aaaaagcagg  gccacccgac  ccgtttggat  atgggagtaa  gagaattggc
361 ccaaacggcg  atgtgggttg  gattgaatat  gttcttctca  ataccaatca  tgaactcatt
421 tctgaaaaat  ccctcttcat  tttgcgggaa  aatcccgaga  ttttccggtg  tgcggtggag
481 gagtatatat  tggcggtgaa  ggagatggct  tgtgaagtgc  tggaagccat  ggcgttaggc
541 ttgaggatag  agaaaagcgc  attgagtagg  ctggtgaagg  atgaaagaag  tgactgttgt
601 ttcaggctga  accattatcc  gccatgcccg  gagctcgaag  ctttgagtgg  cagaaatttg
661 attgggtttg  gggaaacacac  agaccacaaa  ataatatctg  tcttgaaatc  caataacacc
721 gccggactcc  atatctgctt  gagagatggg  aattgggtat  cagtccctcc  tgataacgcc
781 tcctttttca  tcaatgtcgg  tgactcattg  caggatgatga  ctaatgggag  gtttaagagt
841 gtgaagcaca  aggttttagc  tgatccaata  aagtcgaggc  tttcaatgat  ctactttggt
901 gggccgccat  tgaatgaaaa  gattgcacct  ttaccgtcat  taatggagga  gggagagcag
961 agcttgtaca  gagagttcac  ttggtgggat  tataaaacct  ctgcttataa  atcaaggctt
1021 gctgattgta  ggtaggccc  ttttgagatc  aaaactctca  cacctttggt  gacctgaaaa
1081 accccacaaa  acccaaagaa  atataaacia  gagagagaaa  gtatgtgaag  ttcttctgcc
1141 aaaaaaaaaa  aaaa

```

```

1  MVVQSQLVFD  HFAPIKSCKR  TALFTGIPVI  DLKDPEAKTQ  IVKACEDFGF  FKVINHGVSD
61  HLIGDLEAQA  LKFFQLPQSE  KEKAGPPDPF  GYGSKRIGPN  GDVGWIEYVL  LNTNHELISE
121 KSLFILRENF  EIFRCAVEEY  ILAVKEMACE  VLEAMALGLR  IEKSALSRL  KDERSDCCFR
181 LNHYPPECPEL  EALSGRNLI  FGEHTDPQII  SVLKSNNNTAG  LHICLRDGNW  VSVPPDNASF
241 FINVGDSLQV  MTNGRFKSVK  HKVLADPIKS  RLSMIYFGGP  PLNEKIAPLP  SLMEEGEQSL
301 YREFTWWDYK  TSAYKSRLAD  CRLGPFEIKT  LTPLLT*

```

CmPDS-Fragment für pYL156

```

1   GCGTTTAATT TTATAAACCC CGATGAACTT TCTATGCAAT GCATTTTGAT TGCTCTGAAT
61  CGATTTCTTC AGGAAAAGCA TGGCTCTAAG ATGGCTTTCT TGGATGGAAA TCCACCCGAG
121 AGACTTTGCG AGCCAATTGT TGAGCATATT CGATCATTGG GTGGCGAAGT GCGACTTAAT
181 TCAAGGATAC AAAAAATCGA GTTAAACAAT GATGGAACAG TGAAAAAGTT CTTGTTAAGC
241 GATGGGAATG TAATTGAAGG AGATGCTTAT GTCTTTGCCA CTCCTGTTGA TATCTTCAAG
301 CTTCTTTTGC CTAATGACTG GAAAAAGATT ACATACTTCA AAAAGCTGGA AAAATTGGTT
361 GGAGTTCCAG TTATCAATGT CCATATATGG TTCGACCGGA AGCTGCG

```

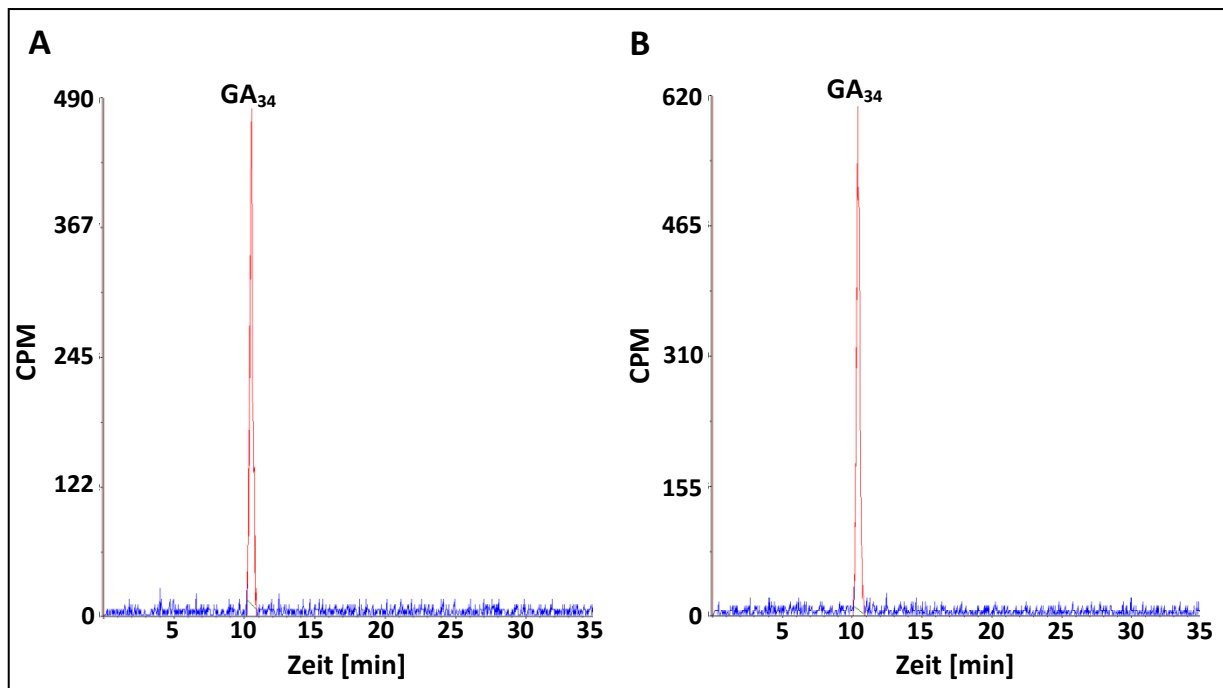
6.3 HPLC-Läufe und Massenspektren der Charakterisierung

Abb. 6.4: HPLC-Läufe des Kontrollansatzes der Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 (A) bzw. CmGA2ox3 (B) mit [^{14}C]GA₃₄

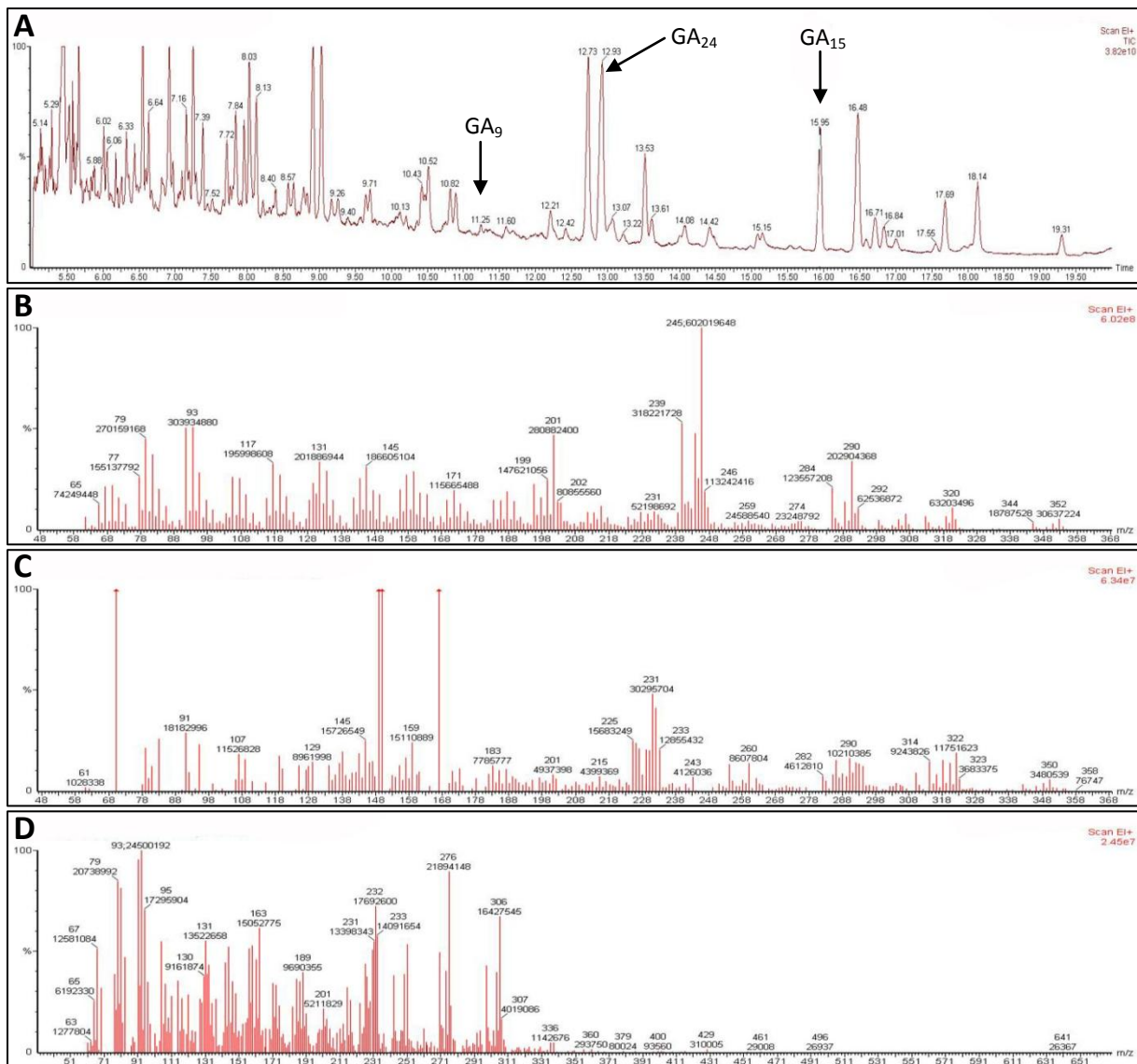


Abb. 6.5: Gaschromatogramm (A) sowie Massenspektrum des bei Inkubation der rekombinanten CmGA20ox4 mit [^{14}C]GA₁₂ synthetisierten GA₁₅ (Retentionszeit: 15,95 min; B), GA₂₄ (Retentionszeit: 12,93 min; C) und GA₉ (Retentionszeit: 11,25 min; D)

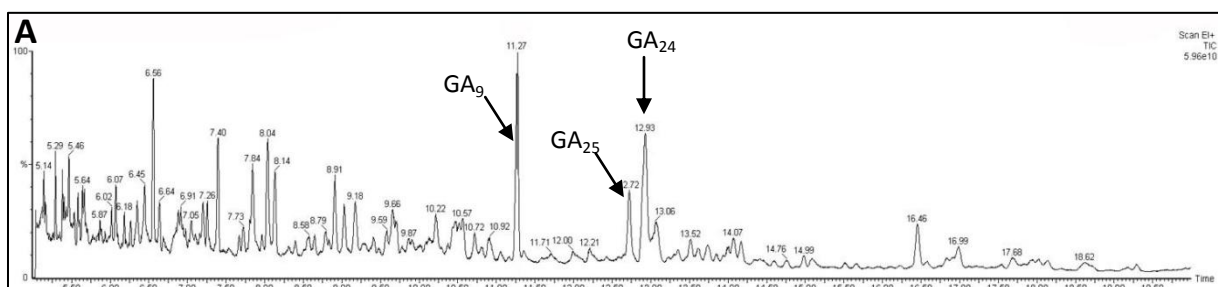


Abb. 6.6a: Gaschromatogramm (A) des bei Inkubation der rekombinanten CmGA20ox4 mit [^{14}C]GA₂₄ synthetisierten GA₂₅

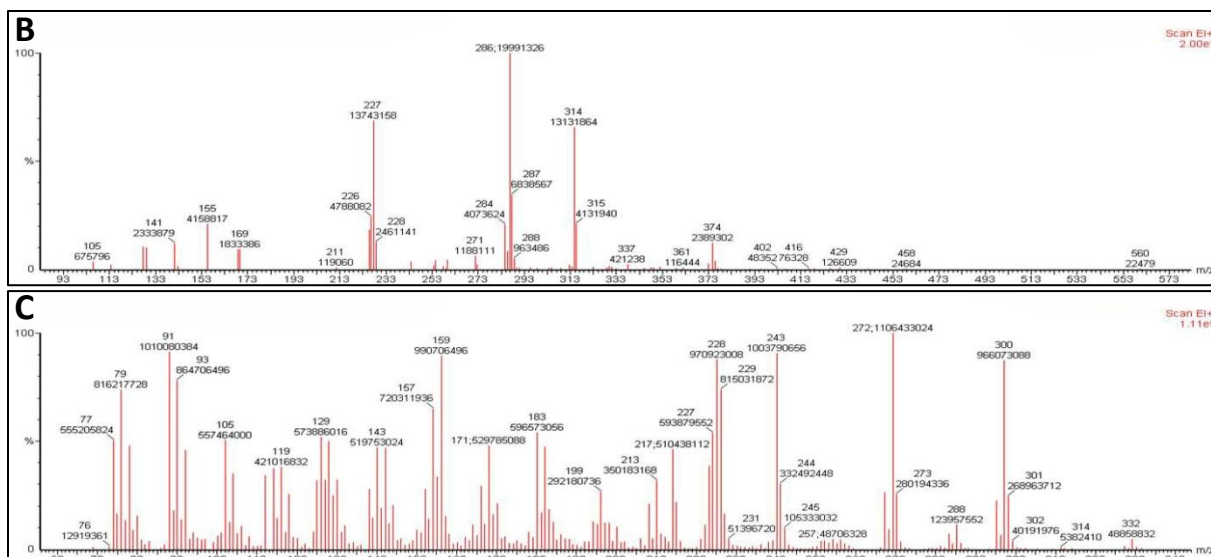


Abb. 6.6b: Massenspektrum des bei Inkubation der rekombinanten CmGA20ox4 mit $[^{14}C]GA_{24}$ synthetisierten GA_{25} (Retentionszeit: 12,67 min; B) und GA_9 (Retentionszeit: 11,27 min; C)

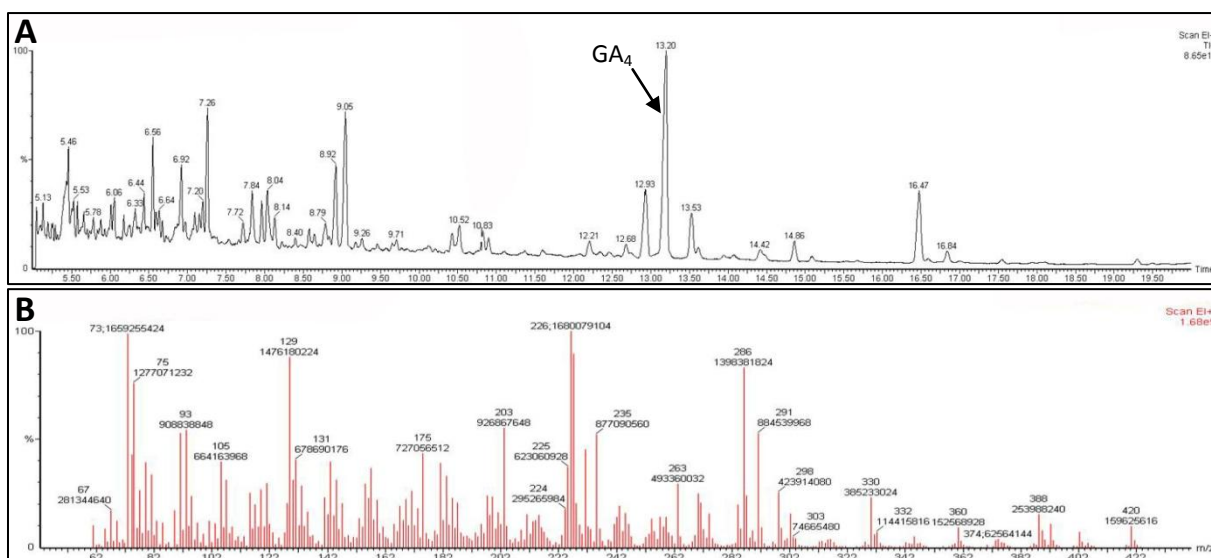


Abb. 6.7: Gaschromatogramm (A) sowie Massenspektrum des bei Inkubation der rekombinanten CmGA3ox4 mit $[^{14}C]GA_9$ synthetisierten GA_4 (Retentionszeit: 13,20 min; B)

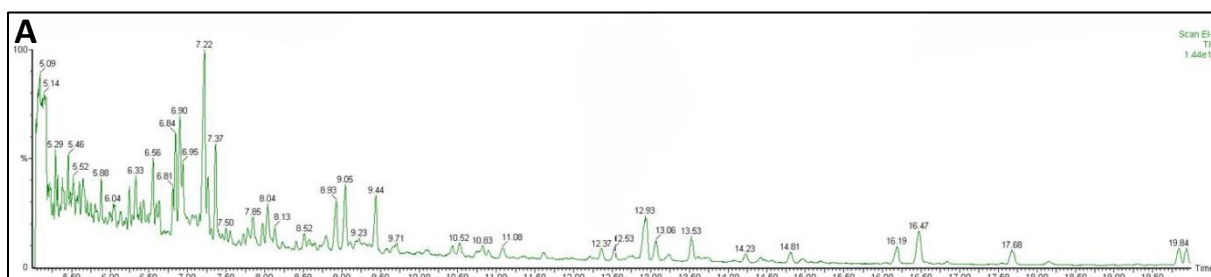


Abb. 6.8a: Gaschromatogramm des ersten aufgefundenen Peaks der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit $[^{14}C]GA_4$

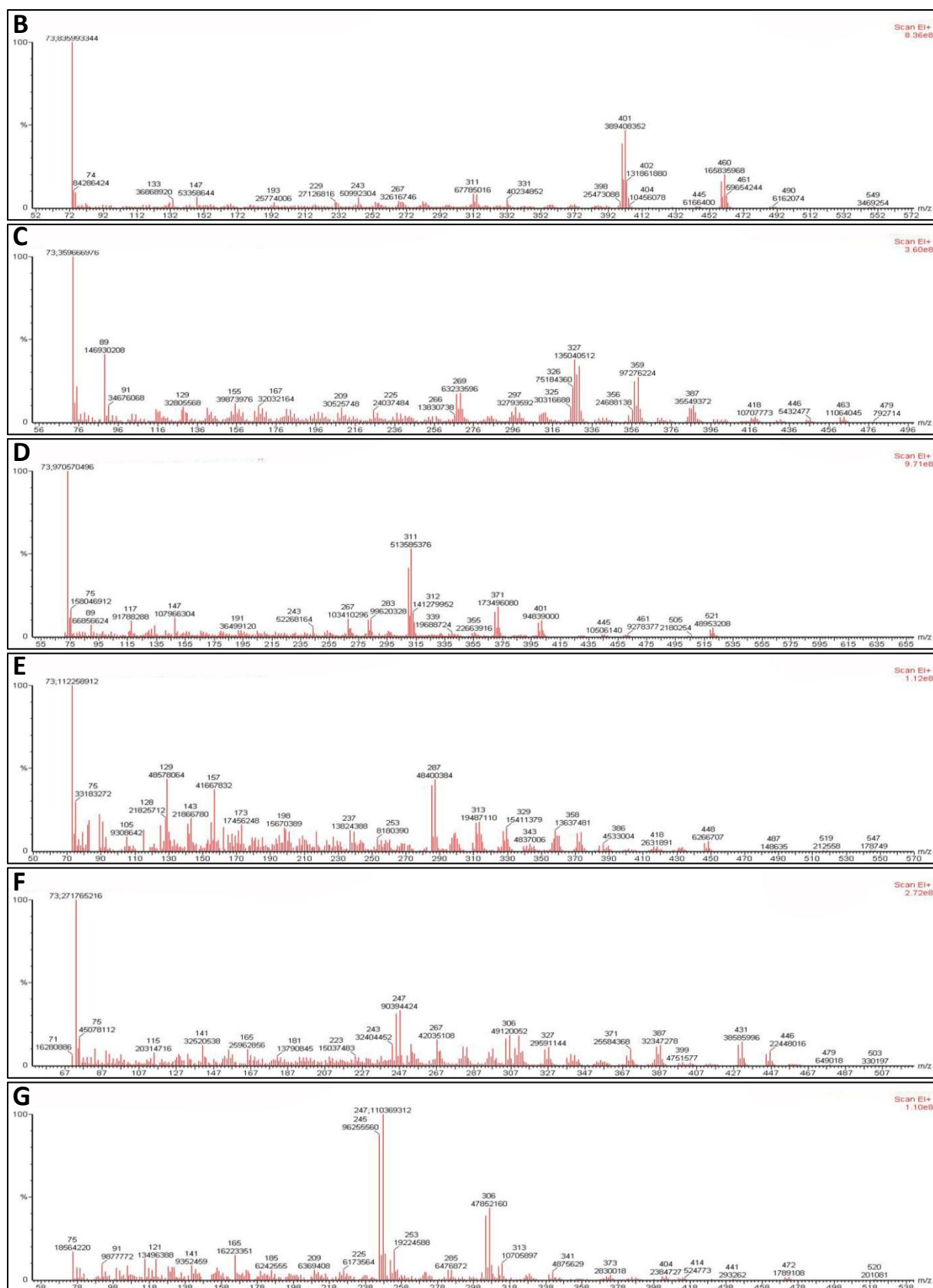


Abb. 6.8b: Massenspektren der synthetisierten GA₃₄-Katabolite (Retentionszeit: 12,37; 12,57; 13,07 bzw. 13,69; B – G) des ersten aufgefundenen Peaks der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit [¹⁴C]GA₄

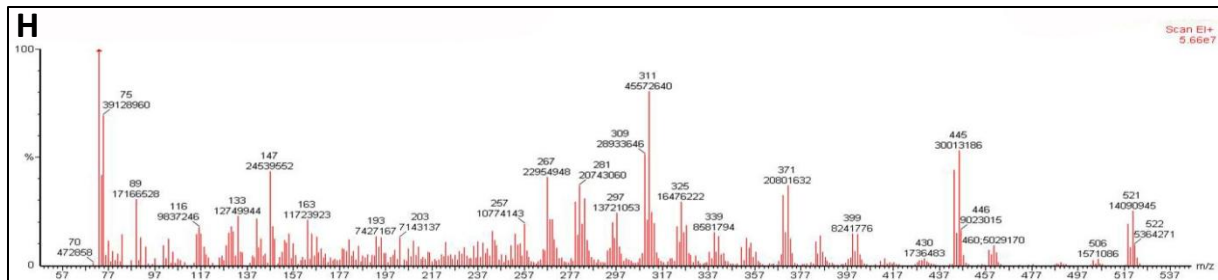


Abb. 6.8c: Massenspektren der synthetisierten GA₃₄-Katabolite (Retentionszeit: 14,97; H) des ersten aufgefundenen Peaks der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit [¹⁴C]GA₄

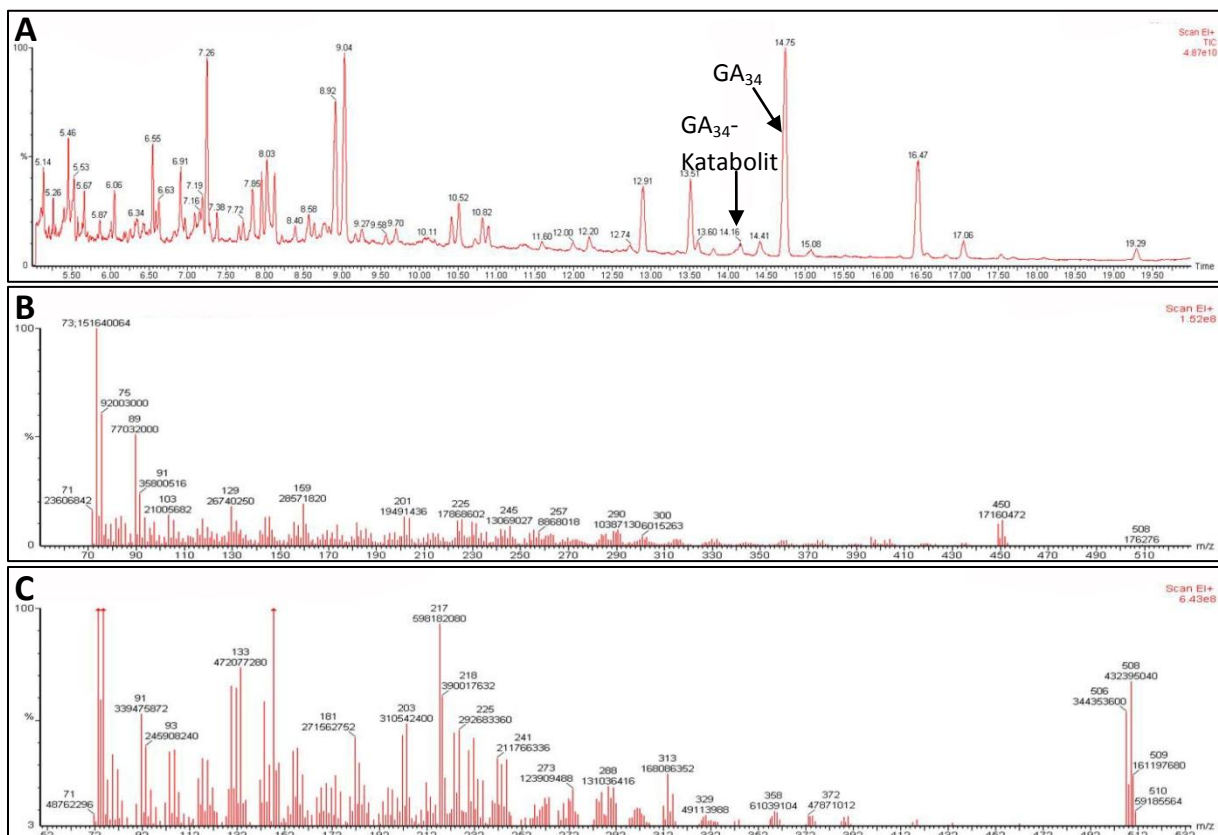


Abb. 6.9: zweiter aufgefundenen Peak der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit [¹⁴C]GA₄; Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum eines synthetisierten GA₃₄-Katabolits (Retentionszeit: 14,16; B) und des GA₃₄ (Retentionszeit: 14,75; C)

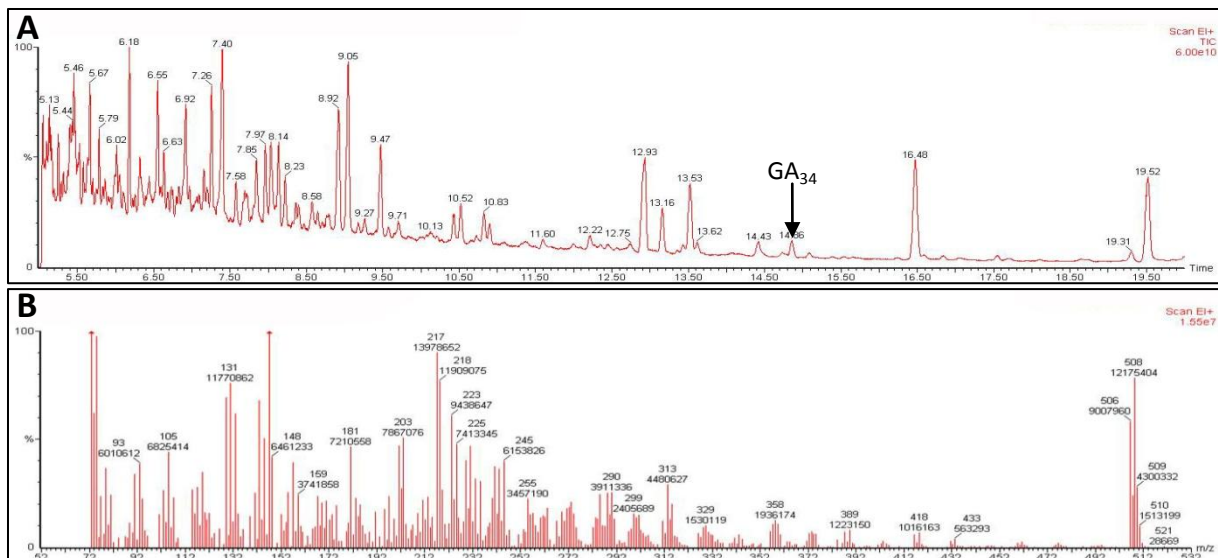


Abb. 6.10: dritter aufgefangener Peak der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit $[^{14}C]GA_4$; Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum des synthetisierten GA_{34} (Retentionszeit: 14,73; B)

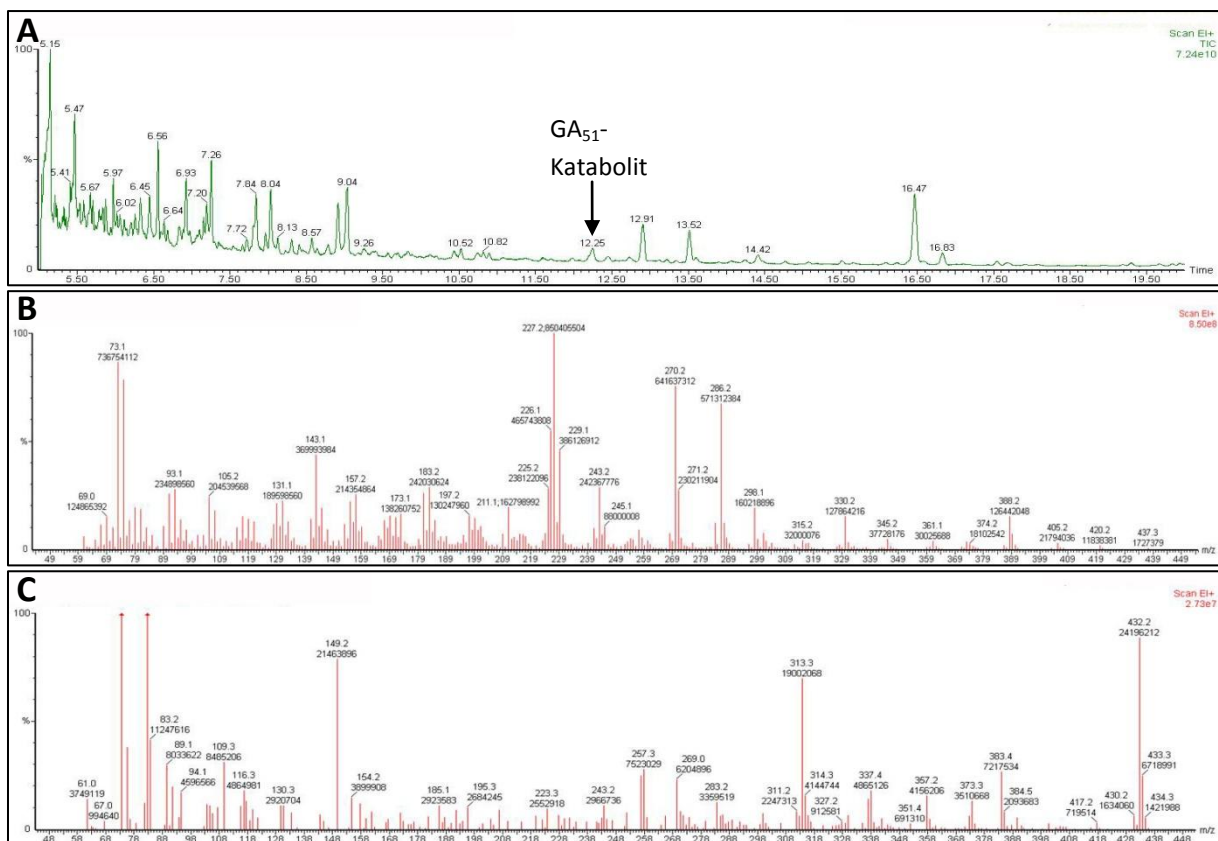


Abb. 6.11: Gaschromatogramm (A) sowie Massenspektrum des bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox2 mit $[^{14}C]GA_9$ synthetisierten GA_{51} (Retentionszeit: 13,29 min; B) und GA_{51} -Katabolit (Retentionszeit: 12,25 min; C)

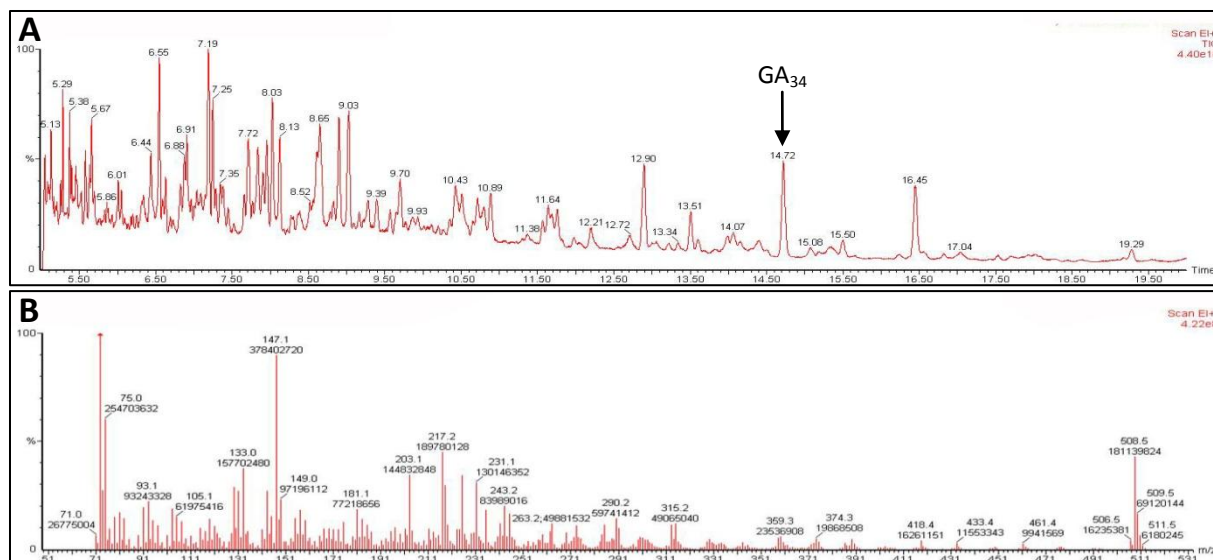


Abb. 6.12: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum des bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}C]GA_4$ synthetisierten GA_{34} (Retentionszeit: 14,72; B)

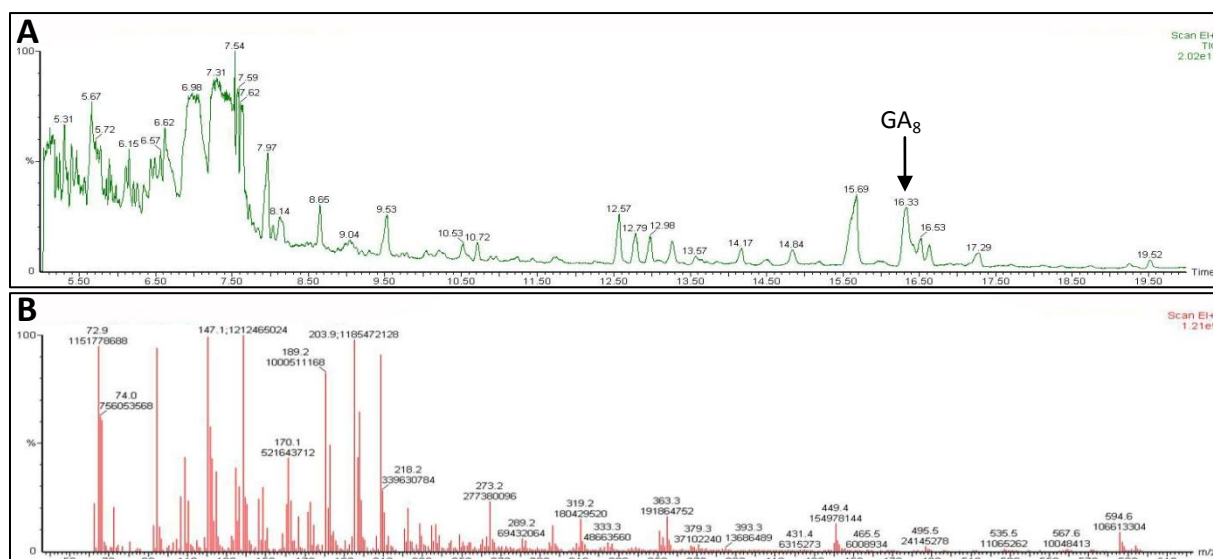


Abb. 6.13: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum des bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}C]GA_1$ synthetisierten GA_8 (Retentionszeit: 16,33; B)

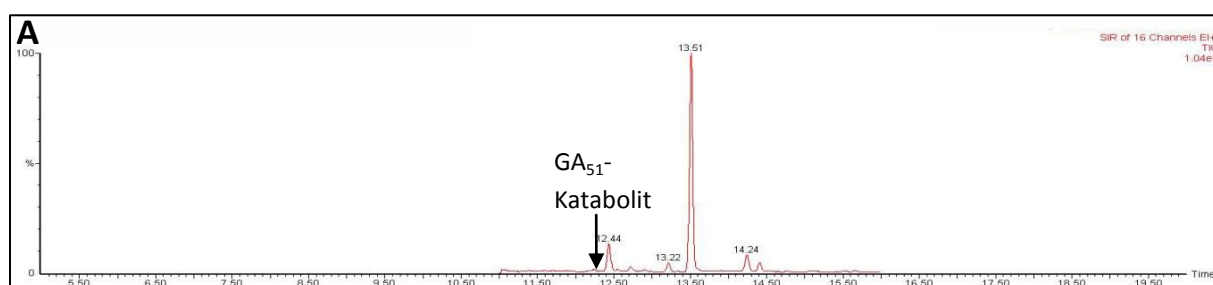


Abb. 6.14a: Gaschromatogramm (A) des ersten aufgefangenen Peaks der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}C]GA_9$

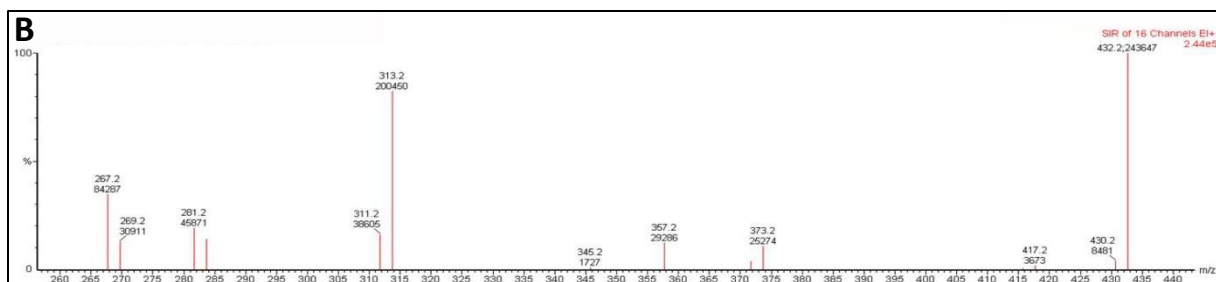


Abb. 6.14b: Massenspektrum des synthetisierten GA_{51} -Katabolits (Retentionszeit: 12,21; B) des ersten aufgefundenen Peaks der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}C]GA_9$

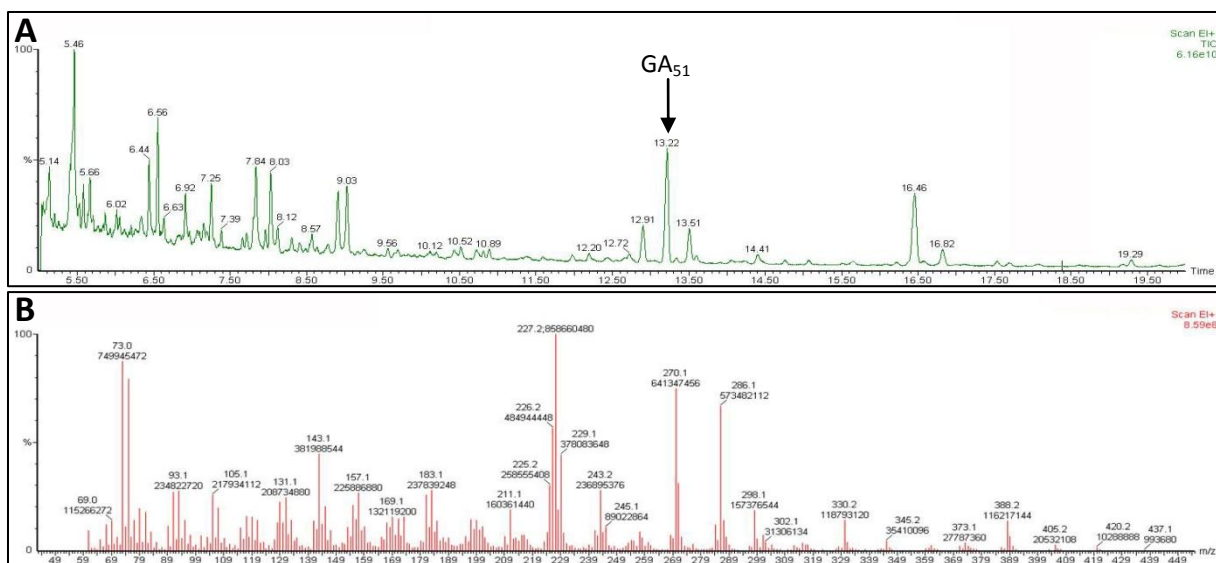


Abb. 6.15: zweiter aufgefundenen Peak der HPLC bei Inkubation der rekombinanten CmGA2ox3 mit $[^{14}C]GA_9$; Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum des synthetisierten GA_{51} (Retentionszeit: 13,22; B)

6.4 Rohdaten und Gelbilder der quantitativen RT-PCR

Tab. 6.10: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen, Gibberellin-Rezeptoren und DELLAs in den Organen der 3 Tage alten Kürbiskeimlingen; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,0001 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox1*, *CmGA20ox4*), 0,001 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox2*) 0,00001 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*) und 0,002 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	1. Pflanzenanzucht				2. Pflanzenanzucht			
	Ws	W	H	K	Ws	W	H	K
<i>CmGA20ox4</i>	0,229	0,055	0,006	*	0,228	0,073	0,048	*
<i>CmGA3ox1</i>	*	*	*	*	/	/	/	/
<i>CmGA3ox2</i>	0,001	*	*	*	0,001	*	*	0,011
<i>CmGA3ox4</i>	0,0002	0,0006	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA2ox2</i>	*	0,007	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA2ox3</i>	0,01	0,55	0,07	0,02	0,01	0,43	0,05	0,03
<i>CmGID1a</i>	0,08	0,17	0,19	0,20	0,07	0,17	0,20	0,20
<i>CmGID1b</i>	0,44	1,17	0,29	0,34	0,34	0,97	0,29	0,33
<i>CmGAIPa</i>	0,99	1,39	1,64	1,71	0,80	1,19	1,47	1,69
<i>CmGAIPb</i>	0,81	1,17	2,01	1,05	0,57	1,02	1,92	1,04

Tab. 6.11: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen, Gibberellin-Rezeptoren und DELLAs in den Organen der 5 Tage alten Kürbiskeimlingen; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,0001 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox1*, *CmGA20ox4*), 0,001 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox2*) 0,00001 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*) und 0,002 $\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	1. Pflanzenanzucht					2. Pflanzenanzucht				
	Ws	W	H	K	Ss	Ws	W	H	K	Ss
<i>CmGA20ox4</i>	0,004	0,001	*	*	*	0,004	0,001	*	*	*
<i>CmGA3ox1</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox2</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox4</i>	0,0008	0,0025	*	*	*	0,0009	0,0022	*	*	*
<i>CmGA2ox2</i>	*	0,013	*	*	*	*	0,012	*	*	*
<i>CmGA2ox3</i>	0,01	0,25	0,18	0,12	0,09	0,01	0,23	0,12	0,09	0,10
<i>CmGID1a</i>	0,06	0,22	0,17	0,27	0,10	0,05	0,19	0,12	0,26	0,10
<i>CmGID1b</i>	0,29	0,91	0,32	0,20	0,23	0,30	0,81	0,08	0,20	0,22
<i>CmGAIPa</i>	0,58	0,75	1,12	1,15	0,71	0,52	0,73	0,26	1,11	0,84
<i>CmGAIPb</i>	0,52	0,68	1,29	0,49	0,22	0,52	0,58	0,44	0,48	0,20

Tab. 6.12: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen, Gibberellin-Rezeptoren und DELLAs in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; als Wiederholung dienen die Kontrollbehandlungen, die in der Tabelle 6.13 aufgeführt sind; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von $0,0001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox1*, *CmGA20ox4*), $0,001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox2*) $0,00001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*) und $0,002 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	1. Pflanzenanzucht				
	Ws	W	H	K	Ss
<i>CmGA20ox4</i>	0,0028	0,0003	*	*	*
<i>CmGA3ox1</i>	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox2</i>	0,001	*	*	*	*
<i>CmGA3ox4</i>	0,0098	0,107	*	*	*
<i>CmGA2ox2</i>	*	0,026	*	*	*
<i>CmGA2ox3</i>	0,14	0,45	0,26	0,69	0,64
<i>CmGID1a</i>	0,18	0,32	0,30	0,30	0,19
<i>CmGID1b</i>	1,00	1,56	0,69	0,46	1,91
<i>CmGAIPa</i>	1,85	1,60	1,42	1,09	1,28
<i>CmGAIPb</i>	0,62	1,44	1,52	0,43	1,26

Tab. 6.13: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen, Gibberellin-Rezeptoren und DELLAs in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen der Kontrollbehandlung; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von $0,0001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*, *CmGA20ox4*), $0,001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox2*) und $0,002 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	1. Pflanzenanzucht					2. Pflanzenanzucht				
	Ws	W	H	K	Ss	Ws	W	H	K	Ss
<i>CmGA20ox4</i>	0,0115	0,0011	*	*	*	0,0035	*	*	*	*
<i>CmGA3ox2</i>	0,001	/	/	/	/	*	/	/	/	/
<i>CmGA3ox4</i>	0,013	0,124	*	*	*	0,010	0,078	*	*	*
<i>CmGA2ox2</i>	*	0,028	*	*	*	*	0,001	*	*	0,006
<i>CmGA2ox3</i>	0,14	0,51	0,56	0,74	0,11	0,14	0,57	0,52	0,73	0,85
<i>CmGID1a</i>	0,13	0,35	0,43	0,44	0,24	0,15	0,32	0,31	0,28	0,37
<i>CmGID1b</i>	0,91	1,77	1,02	0,78	1,48	0,84	1,40	0,54	0,18	1,71
<i>CmGAIPa</i>	1,25	0,96	1,41	1,24	1,25	1,23	1,02	1,60	1,05	1,26
<i>CmGAIPb</i>	0,58	1,18	1,62	0,53	1,12	0,78	0,98	1,51	0,42	0,96

Tab. 6.14: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen, Gibberellin-Rezeptoren und DELLAs in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen der 10^{-5}M LAB 150 975-Behandlung; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von $0,0001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*, *CmGA20ox4*), $0,001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox2*) und $0,002 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	1. Pflanzenanzucht					2. Pflanzenanzucht				
	Ws	W	H	K	Ss	Ws	W	H	K	Ss
<i>CmGA20ox4</i>	0,2267	0,0580	*	*	*	0,0555	0,0233	*	*	*
<i>CmGA3ox2</i>	*	/	/	/	/	0,001	/	/	/	/
<i>CmGA3ox4</i>	2,395	3,663	0,002	*	0,003	1,470	2,346	0,002	*	0,001
<i>CmGA2ox2</i>	*	0,028	*	*	*	*	0,254	*	*	0,004
<i>CmGA2ox3</i>	0,03	0,29	0,28	0,32	0,09	0,004	0,22	0,22	0,23	0,86
<i>CmGID1a</i>	0,17	0,44	0,41	0,35	0,31	0,08	0,37	0,41	0,32	0,27
<i>CmGID1b</i>	1,88	3,27	1,57	1,67	3,12	0,98	3,27	1,88	1,16	2,86
<i>CmGAIPa</i>	1,29	0,86	1,48	1,05	1,27	0,30	0,93	1,52	0,92	1,20
<i>CmGAIPb</i>	0,88	1,13	1,49	0,44	1,41	0,28	0,99	1,51	0,34	0,84

Tab. 6.15: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen, Gibberellin-Rezeptoren und DELLAs in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen der 10^{-6}M GA₄-Behandlung; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von $0,0001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*, *CmGA20ox4*), $0,001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox2*) und $0,002 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	1. Pflanzenanzucht					2. Pflanzenanzucht				
	Ws	W	H	K	Ss	Ws	W	H	K	Ss
<i>CmGA20ox4</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox4</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA2ox2</i>	*	0,032	*	*	*	*	0,026	*	*	0,005
<i>CmGA2ox3</i>	0,05	1,50	2,26	2,72	0,10	0,05	1,42	2,19	2,52	1,00
<i>CmGID1a</i>	0,09	0,34	0,37	0,40	0,20	0,03	0,32	0,39	0,35	0,28
<i>CmGID1b</i>	0,17	0,52	0,13	0,30	0,28	0,14	0,41	0,13	0,22	0,54
<i>CmGAIPa</i>	0,86	1,17	1,40	1,05	1,41	0,33	1,03	1,54	1,00	1,35
<i>CmGAIPb</i>	0,58	1,41	1,77	0,51	1,21	0,48	1,09	1,36	0,42	0,93

Tab. 6.16: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen und Gibberellin-Rezeptoren in den Organen der männlichen Kürbisblüten des Stadiums I, II, III und IV der ersten Pflanzenanzucht; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von $0,01 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA20ox3*), $0,001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox3*), $0,0001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*), $0,002 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	Stadium I		Stadium II		Stadium III		Stadium IV			
	HSP	St	HSP	St	HSP	St	H	S	P	St
<i>CmGA7ox</i>	/	/	0,23	0,01	0,45	0,04	/	/	/	/
<i>CmGA20ox3</i>	/	/	*	0,65	*	0,30	/	/	/	/
<i>CmGA20ox4</i>	0,0004	0,036	0,0084	0,041	0,003	0,001	0,316	0,028	0,003	0,046
<i>CmGA3ox1</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox2</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox3</i>	/	/	0,015	*	0,008	*	/	/	/	/
<i>CmGA3ox4</i>	*	*	*	0,028	*	0,042	0,0001	*	*	0,002
<i>CmGA2ox1</i>	/	/	0,058	0,007	0,039	0,01	/	/	/	/
<i>CmGA2ox2</i>	*	*	*	*	*	*	4,014	0,002	0,107	0,899
<i>CmGA2ox3</i>	0,12	0,09	0,07	0,11	0,07	0,13	3,93	4,30	4,65	1,42
<i>CmGID1a</i>	0,23	0,21	0,14	0,16	0,07	0,09	0,22	0,53	0,28	0,40
<i>CmGID1b</i>	1,03	1,14	0,11	0,11	0,09	0,27	5,42	14,38	13,75	17,50

Tab. 6.17: Transkriptgehalte [$\mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA] der Gibberellin-Dioxygenasen und Gibberellin-Rezeptoren in den Organen der männlichen Kürbisblüten des Stadiums I, II, III und IV der zweiten Pflanzenanzucht; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * Transkriptgehalt unterhalb der Nachweisgrenze von $0,01 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA20ox3*), $0,001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox3*), $0,0001 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA3ox4*), $0,002 \mu\text{g/g}$ Gesamt-RNA (*CmGA2ox2*)

	Stadium I		Stadium II		Stadium III		Stadium IV			
	HSP	St	HSP	St	HSP	St	H	S	P	St
<i>CmGA7ox</i>	/	/	0,17	0,01	0,05	0,03	/	/	/	/
<i>CmGA20ox3</i>	/	/	*	0,52	*	0,15	/	/	/	/
<i>CmGA20ox4</i>	0,0003	0,059	0,0001	0,029	0,002	0,001	0,135	0,002	0,029	0,021
<i>CmGA3ox1</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox2</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>CmGA3ox3</i>	/	/	0,006	*	*	*	/	/	/	/
<i>CmGA3ox4</i>	*	*	*	0,018	*	0,044	*	*	*	0,002
<i>CmGA2ox1</i>	/	/	0,041	0,010	0,027	0,008	/	/	/	/
<i>CmGA2ox2</i>	*	*	*	*	*	*	4,547	0,018	0,140	0,382
<i>CmGA2ox3</i>	0,08	0,11	0,05	0,07	0,04	0,11	4,04	4,54	2,85	1,48
<i>CmGID1a</i>	0,08	0,15	0,09	0,11	0,04	0,06	0,16	0,37	0,16	0,23
<i>CmGID1b</i>	0,70	1,41	0,14	0,20	0,06	0,05	3,96	10,98	15,02	18,68

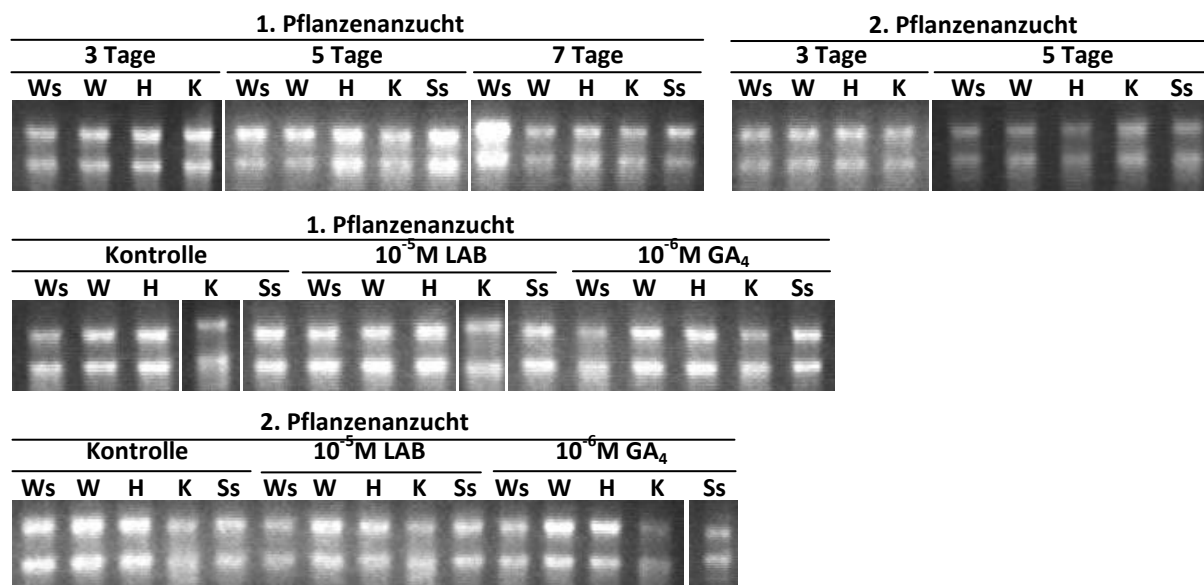


Abb. 6.16: Gesamt-RNA der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlinge sowie der 7 Tage alten Kürbiskeimlinge der Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA_4 ; aufgetragen wurden 300 – 1000 ng Gesamt-RNA; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

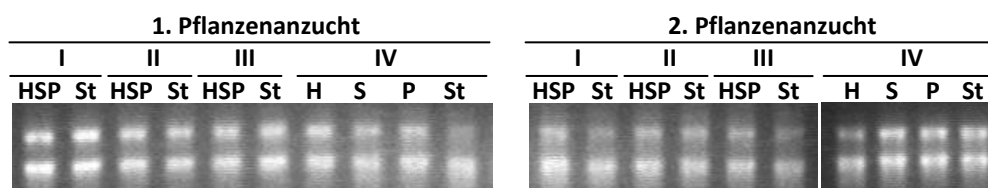


Abb. 6.17: Gesamt-RNA der männlichen Kürbisblüten des Stadiums I, II, III und IV; aufgetragen wurden 200 – 800 ng Gesamt-RNA H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

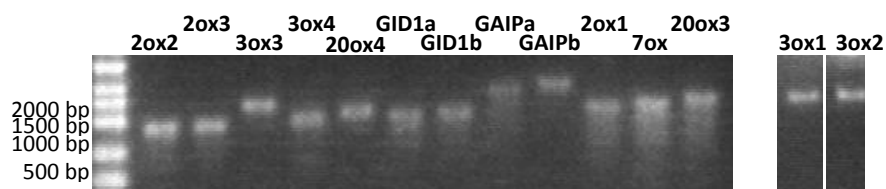


Abb. 6.18: Standard-RNA der *CmGA2ox1*, *CmGA2ox2*, *CmGA2ox3*, *CmGA3ox1*, *CmGA3ox2*, *CmGA3ox3*, *CmGA3ox4*, *CmGA20ox3*, *CmGA20ox4*, *CmGA7ox*, *CmGID1a*, *CmGID1b*, *CmGAIPa*, *CmGAIPb*, aufgetragen wurden 100 – 200 ng

Tab. 6.17: eingesetzte Mengen an Gesamt-RNA zur Quantifizierung der Transkriptgehalte in 3 Tage, 5 Tage (1. Pflanzenanzucht / 2. Pflanzenanzucht) und 7 Tage alten Keimlingen bzw. der mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 und 10^{-6} M GA₄ behandelten Keimlingen bzw. der männlichen Blüten

	Keimlinge			7 Tage Keimlinge			Blüten
	3 Tage	5 Tage	7 Tage	Kontrolle	10^{-5} M LAB	10^{-6} M GA ₄	
<i>CmGA7ox</i>	/	/	/	/	/	/	50 ng
<i>CmGA20ox3</i>	/	/	/	/	/	/	50 ng
<i>CmGA20ox4</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
<i>CmGA3ox1</i>	500 - 1000 ng	500 -1000 ng/ 500 -1000 ng	500 - 1000 ng	500 - 1000 ng	500 - 1000 ng	/	500 ng
<i>CmGA3ox2</i>	500 - 1000 ng	500 -1000 ng/ 500 -1000 ng	500 - 1000 ng	500 - 1000 ng	500 - 1000 ng	/	500 ng
<i>CmGA3ox3</i>	/	/	/	/	/	/	50 ng
<i>CmGA3ox4</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
<i>CmGA2ox1</i>	/	/	/	/	/	/	50 ng
<i>CmGA2ox2</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
<i>CmGA2ox3</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
<i>CmGID1a</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
<i>CmGID1b</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
<i>CmGAIPa</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
<i>CmGAIPb</i>	100 ng	100 ng / 50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng

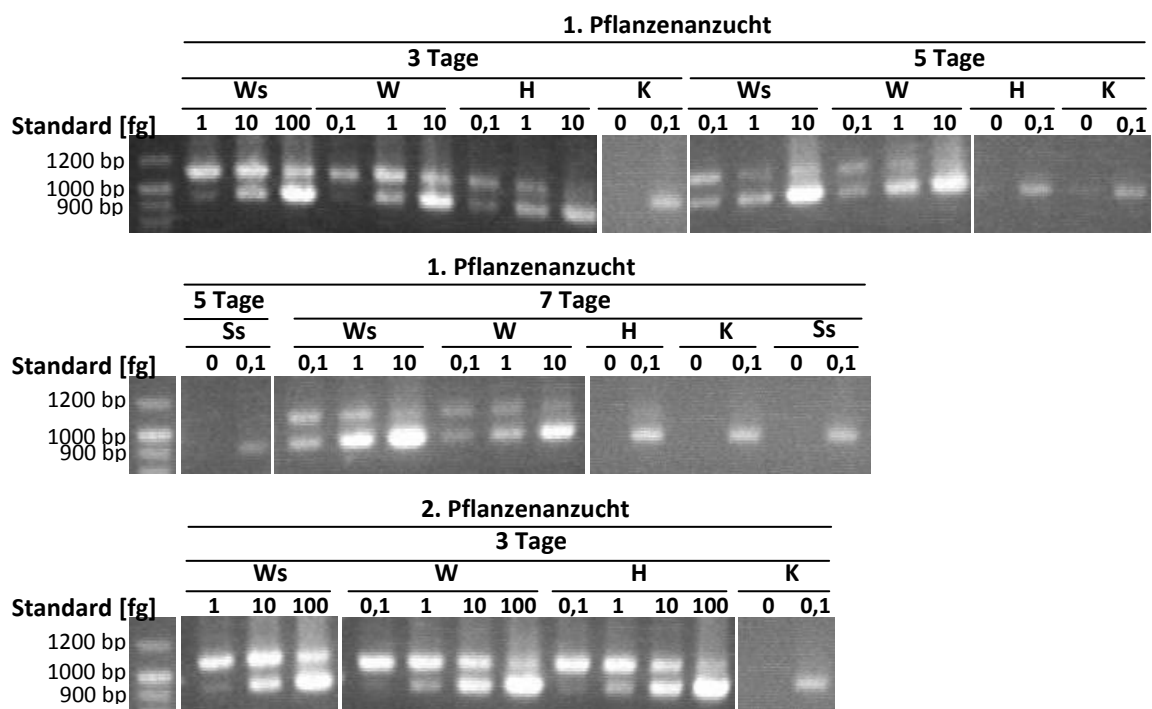


Abb. 6.19a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA20ox4* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 1094 bp, Standardbande: 940 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

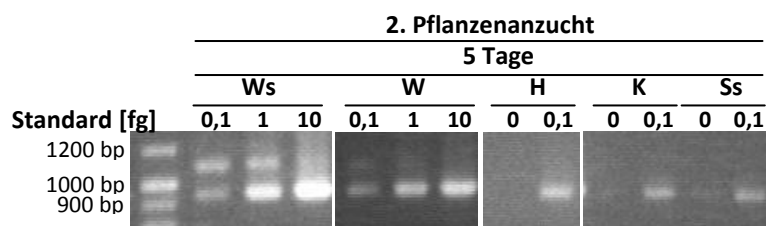


Abb. 6.19b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA20ox4* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 1094 bp, Standardbande: 940 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

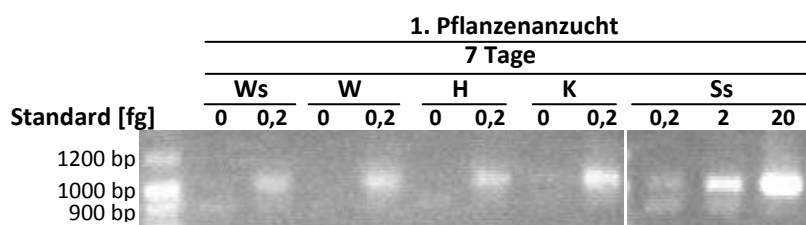


Abb. 6.20: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox1* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 901 bp, Standardbande: 1050 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

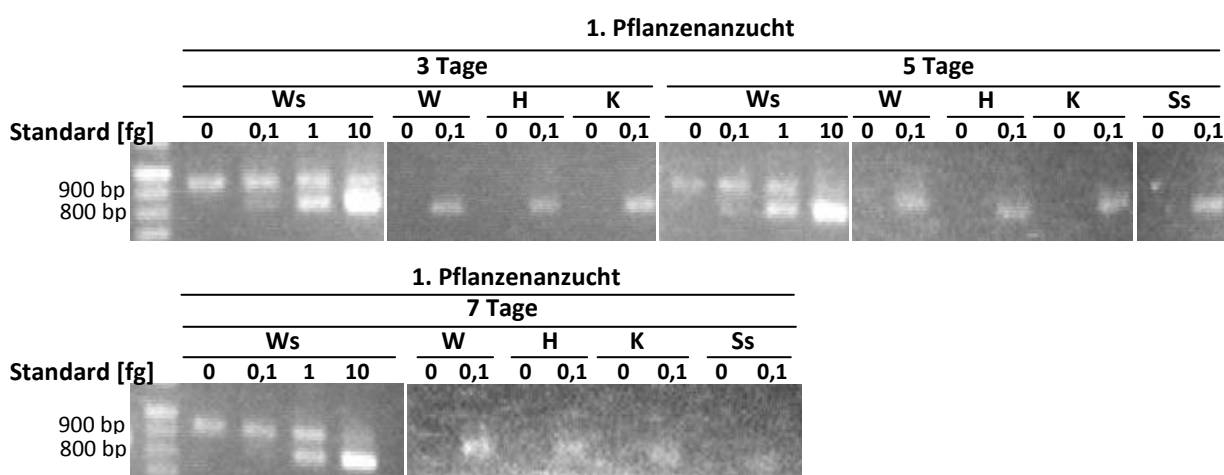


Abb. 6.21a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox2* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 935 bp, Standardbande: 815 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze



Abb. 6.21b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox2* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 935 bp, Standardbande: 815 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

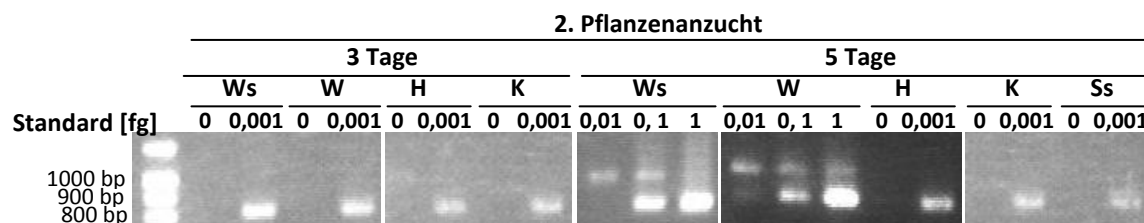
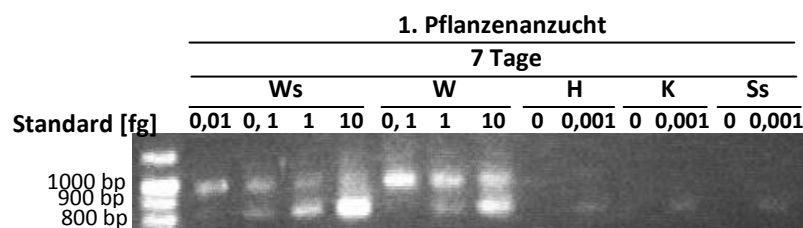
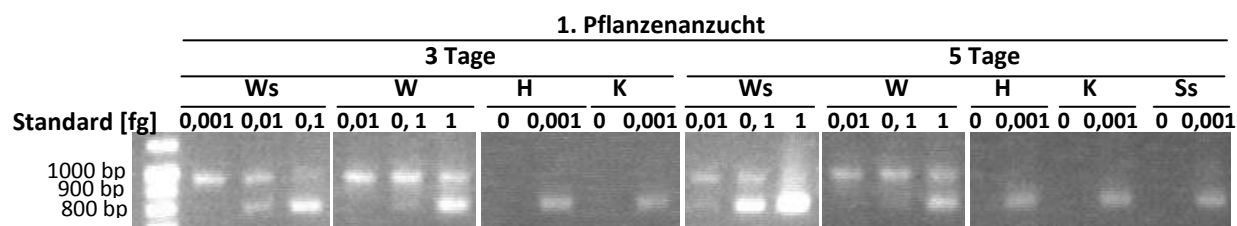


Abb. 6.22: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox4* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 975 bp, Standardbande: 817 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

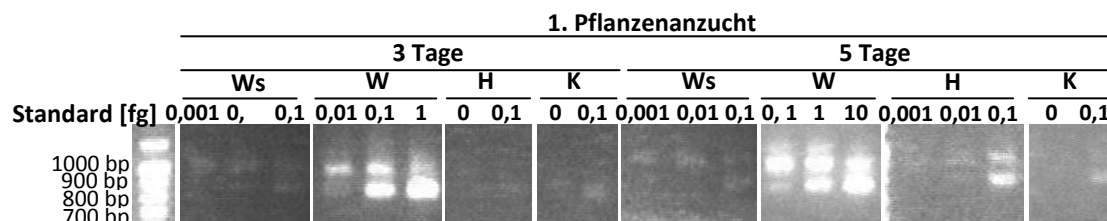


Abb. 6.23a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 943 bp, Standardbande: 786 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

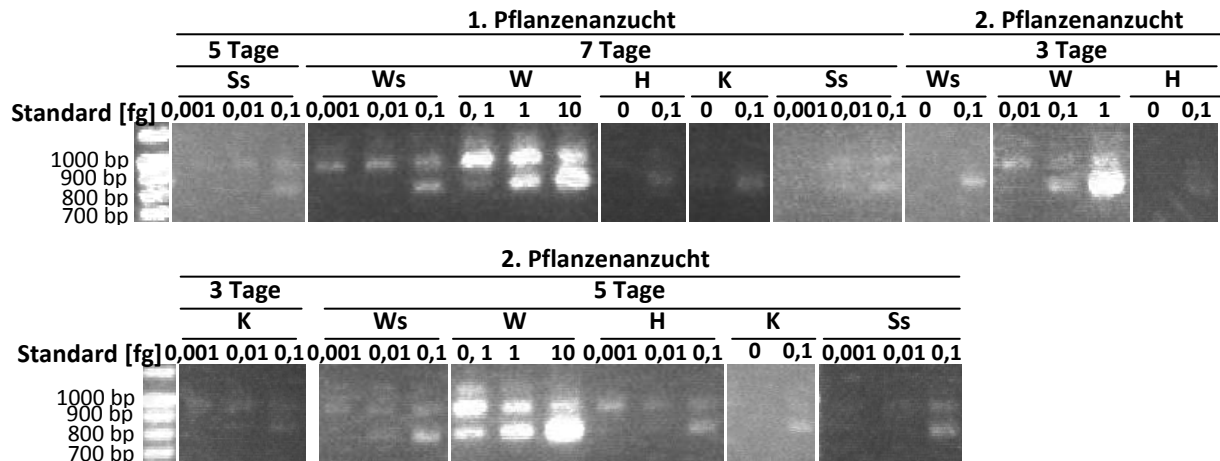


Abb. 6.23b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 943 bp, Standardbande: 786 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

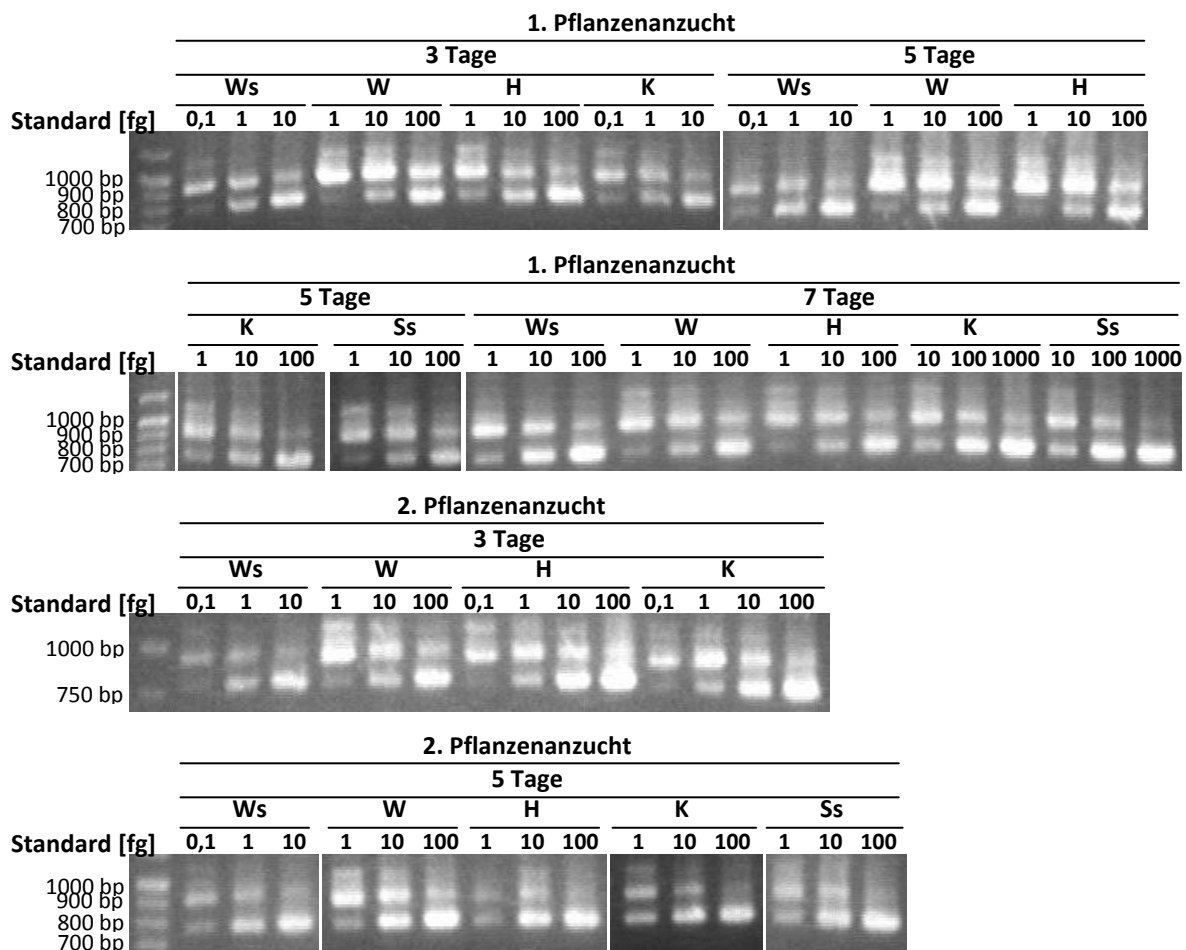


Abb. 6.24: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox3* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 922 bp, Standardbande: 778 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

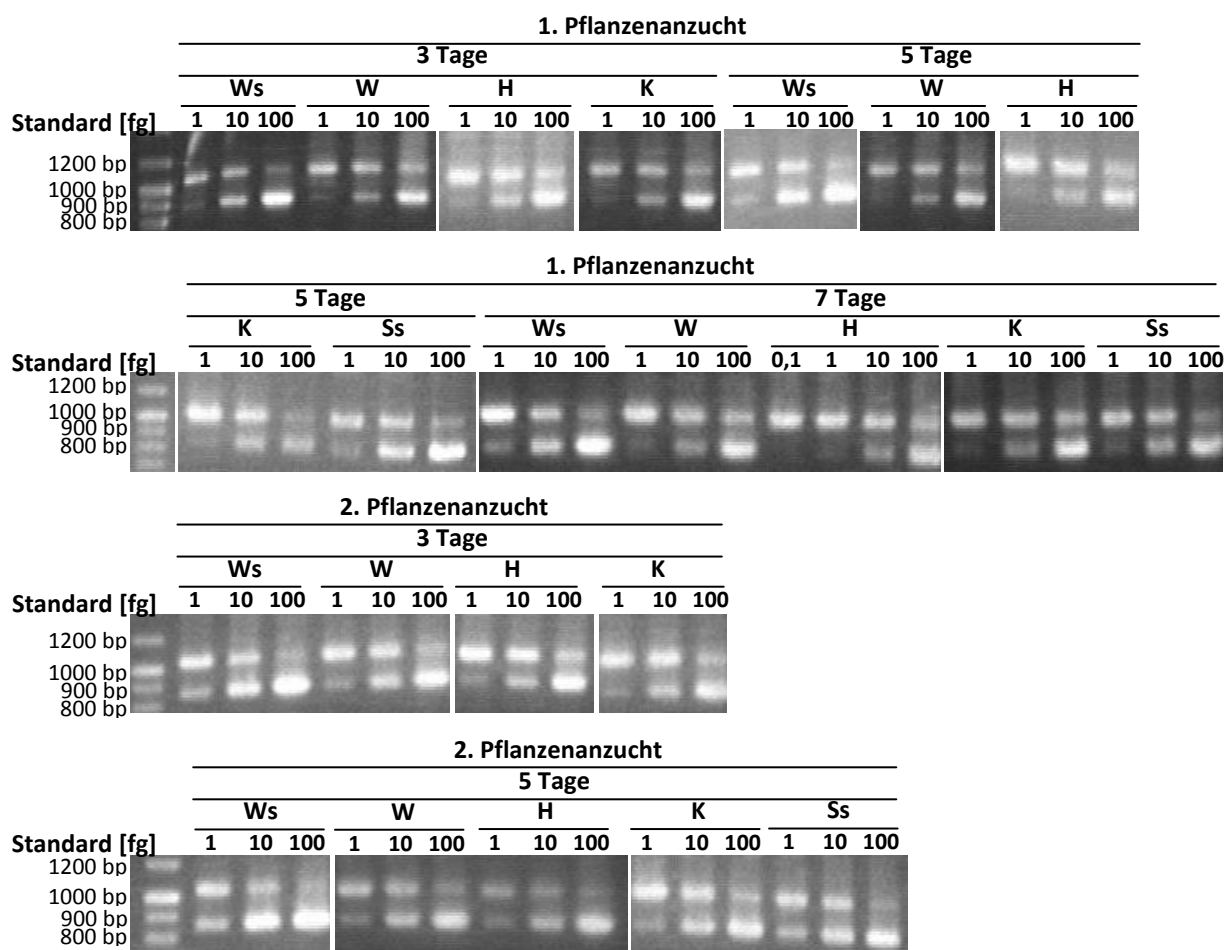


Abb. 6.25: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1a* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 1043 bp, Standardbande: 866 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

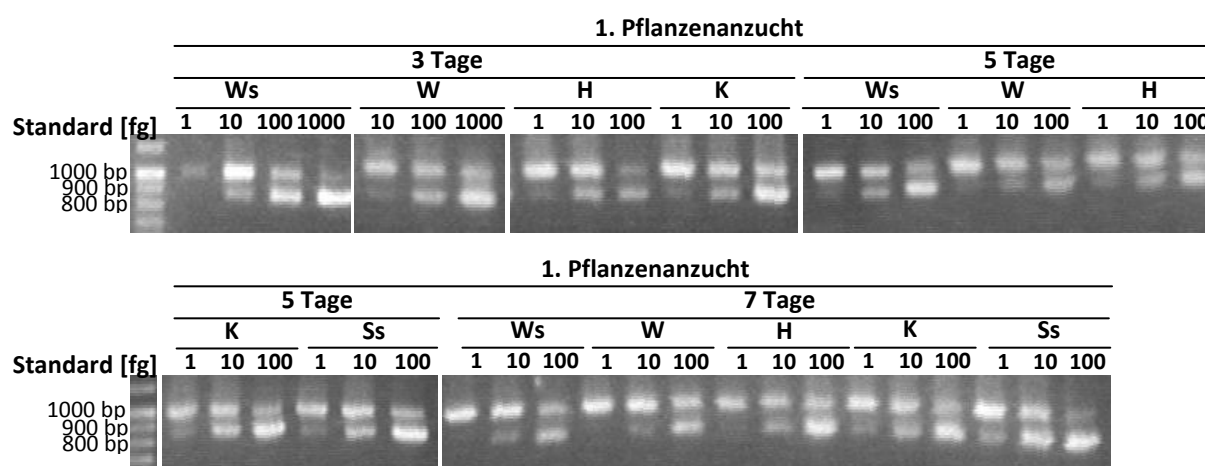


Abb. 6.26a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1b* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 983 bp, Standardbande: 836 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

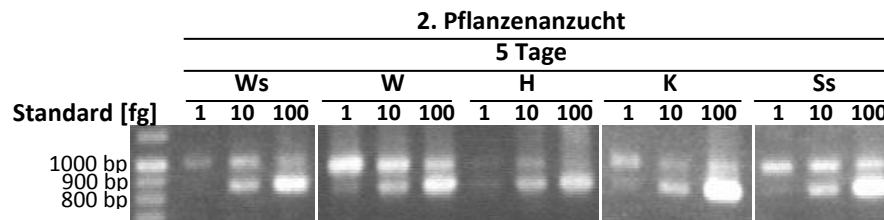
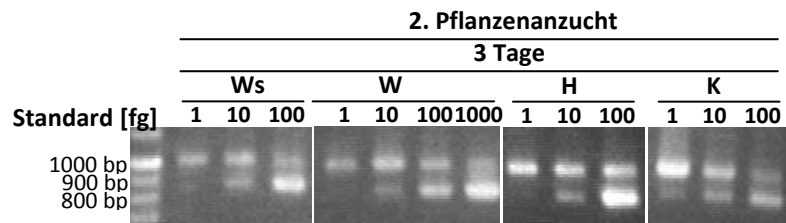


Abb. 6.26b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1b* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 983 bp, Standardbande: 836 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

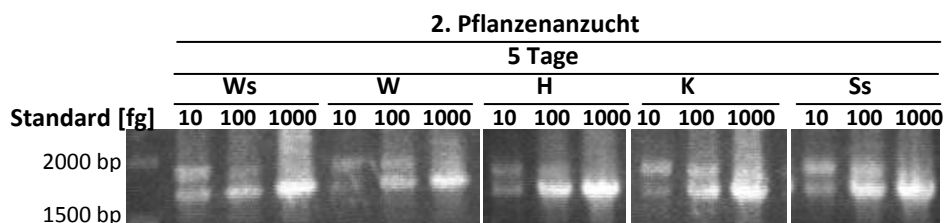
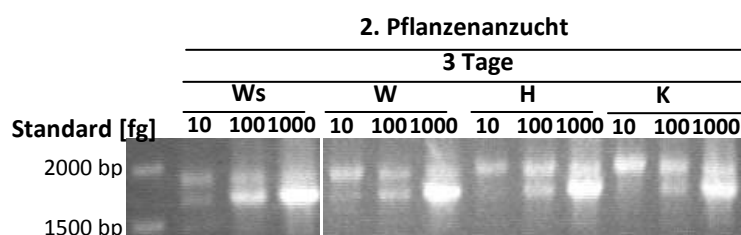
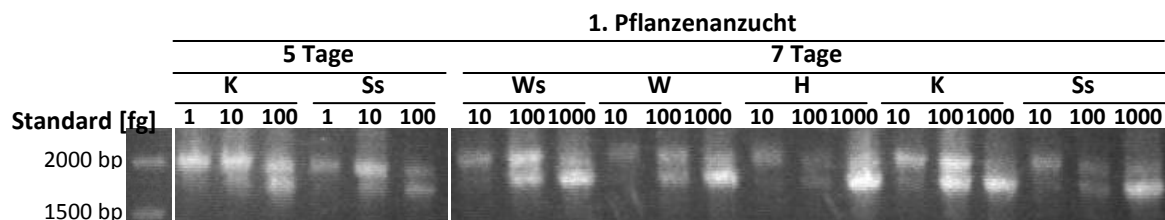
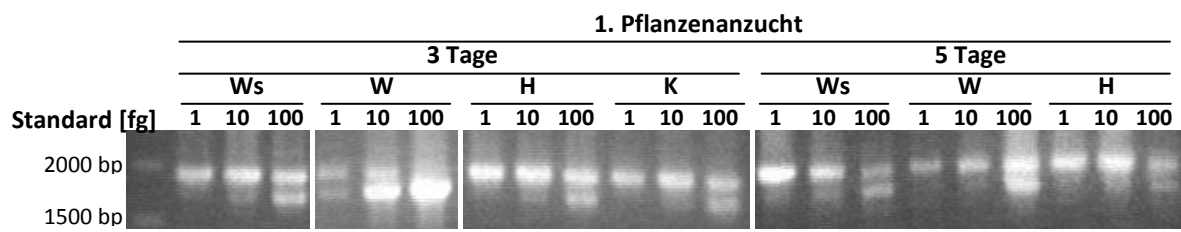


Abb. 6.27: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGAIPa* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 1891 bp, Standardbande: 1681 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

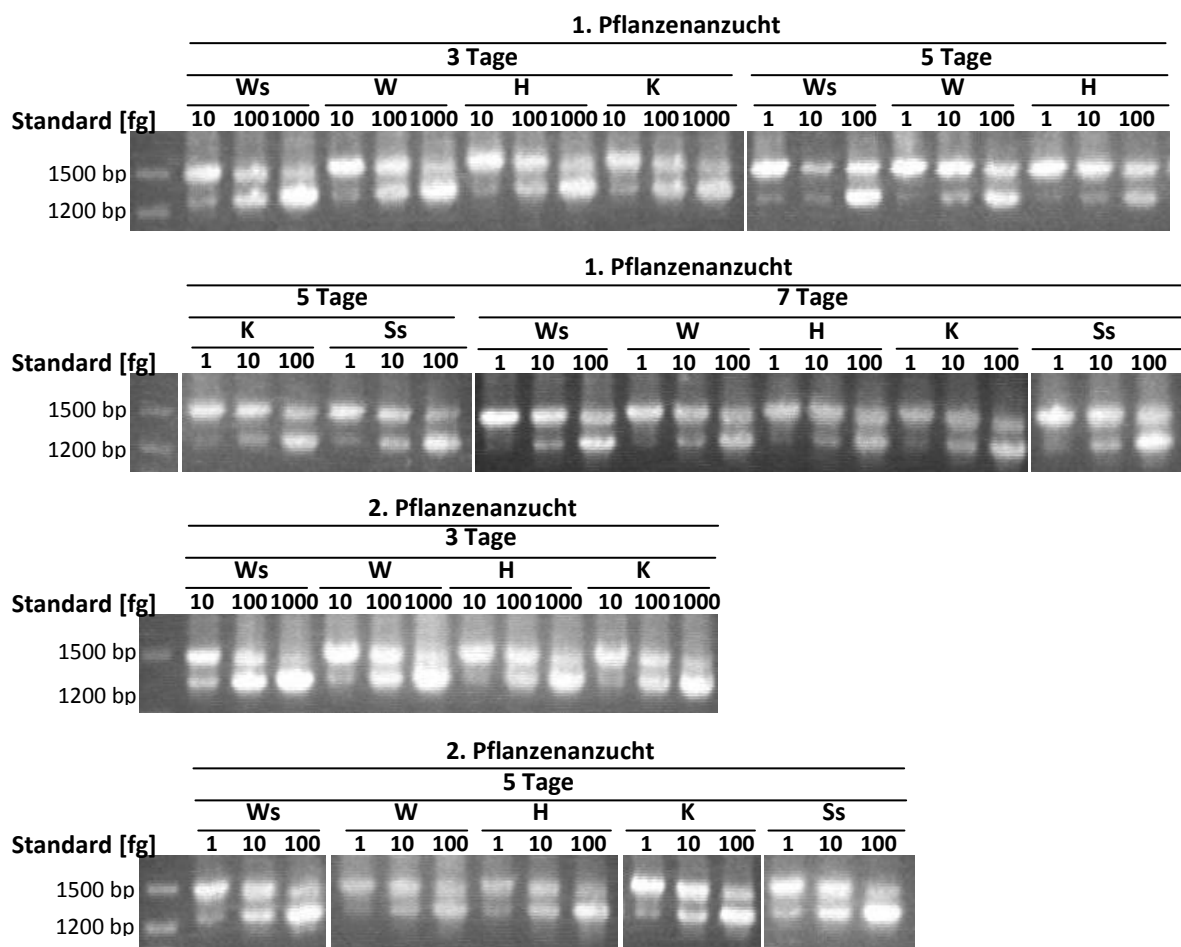


Abb. 6.28: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGAIPb* in den Organen der 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage alten Kürbiskeimlingen; Transkriptbande: 1484 bp, Standardbande: 1257 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

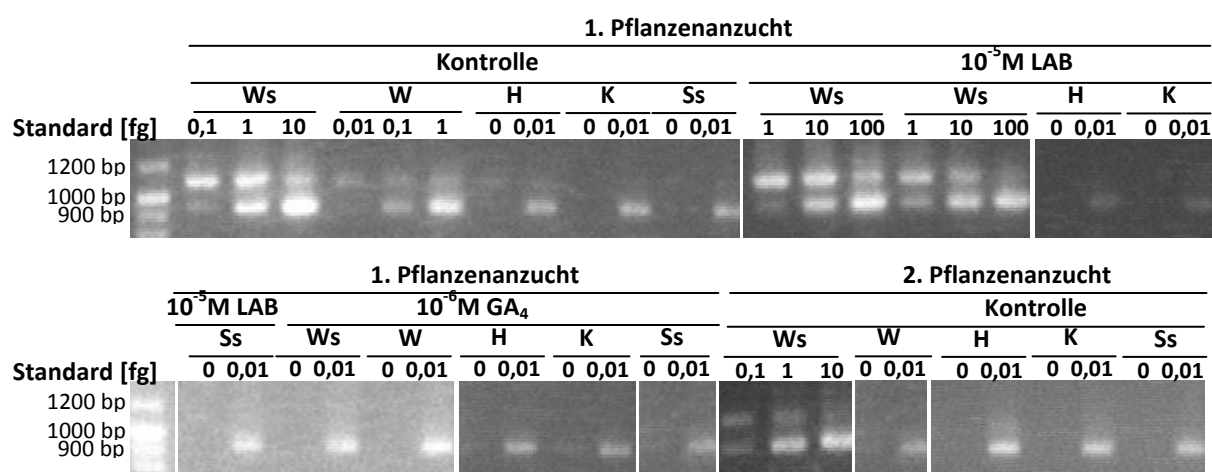


Abb. 6.29a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA20ox4* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 1094 bp, Standardbande: 940 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

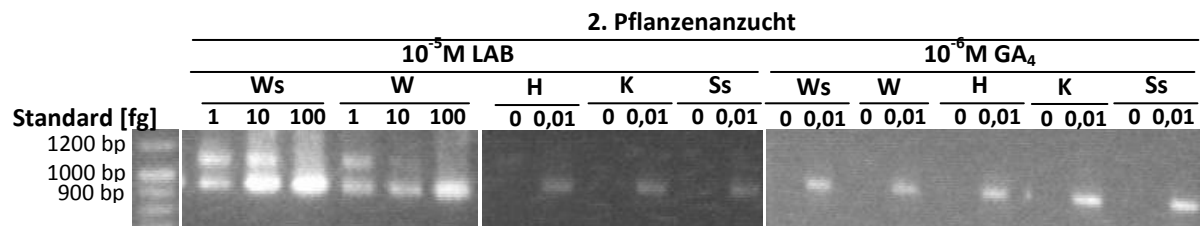


Abb. 6.29b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA20ox4* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 1094 bp, Standardbande: 940 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

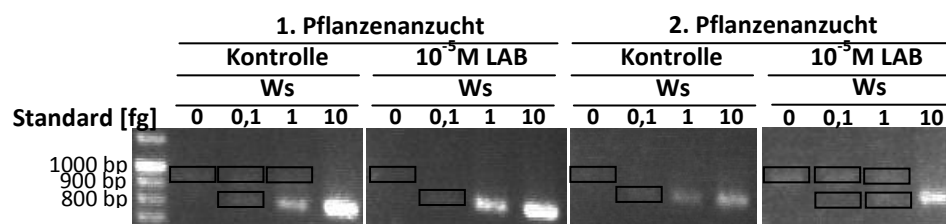


Abb. 6.30: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox2* in der Wurzelspitze (Ws) der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser bzw. 10^{-5} M LAB 150 978; Transkriptbande: 935 bp, Standardbande: 815 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

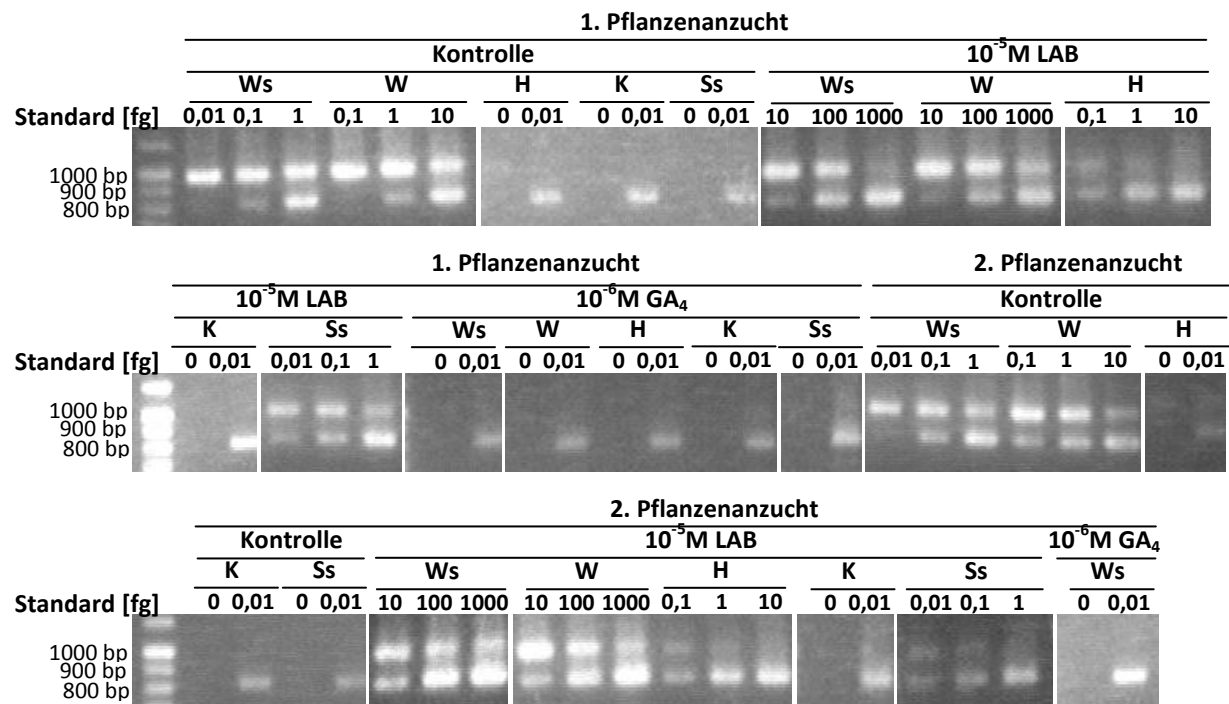


Abb. 6.31a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox4* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 975 bp, Standardbande: 817 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

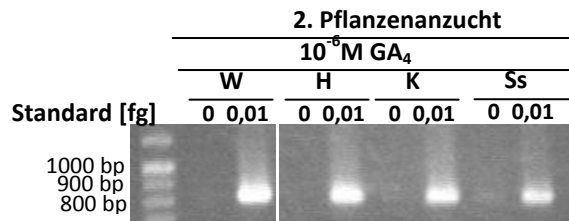


Abb. 6.31b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox4* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 975 bp, Standardbande: 817 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

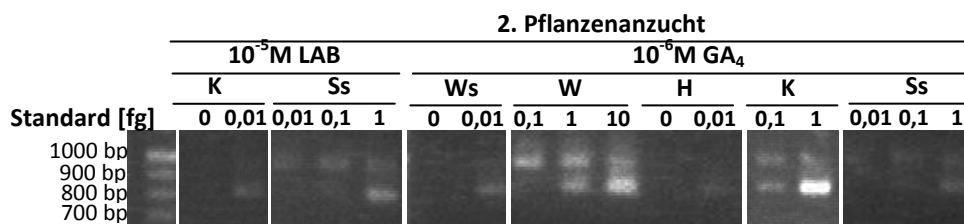
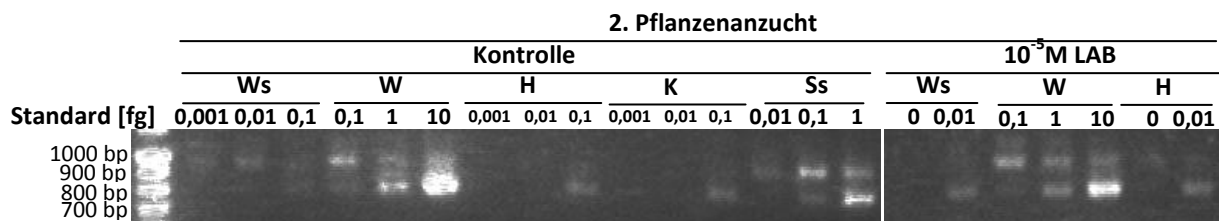
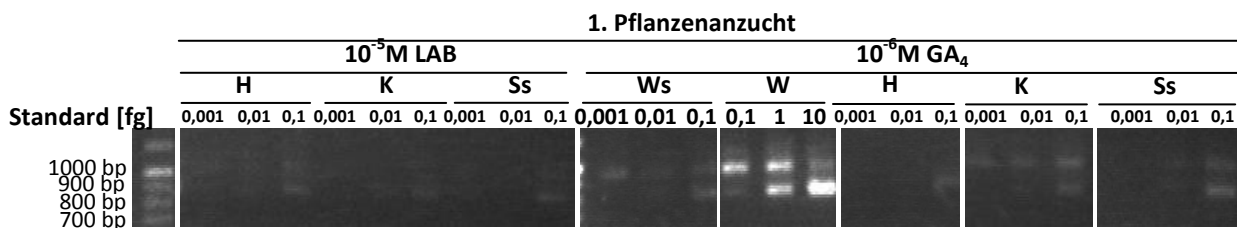
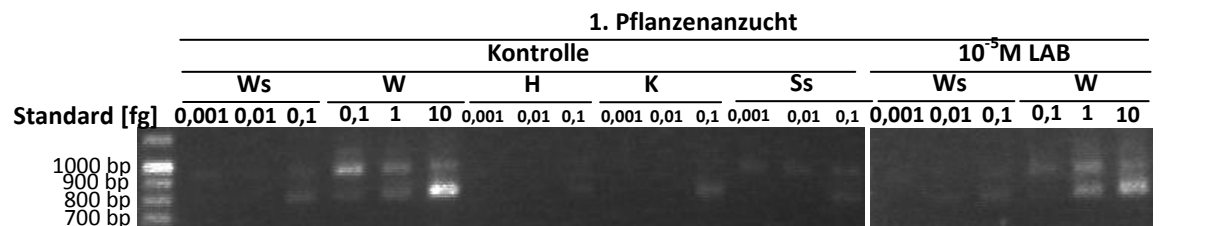


Abb. 6.32: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 943 bp, Standardbande: 786 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

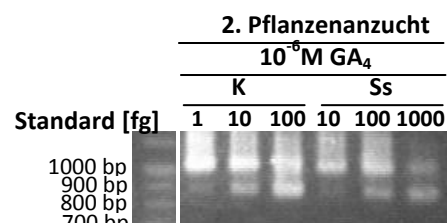
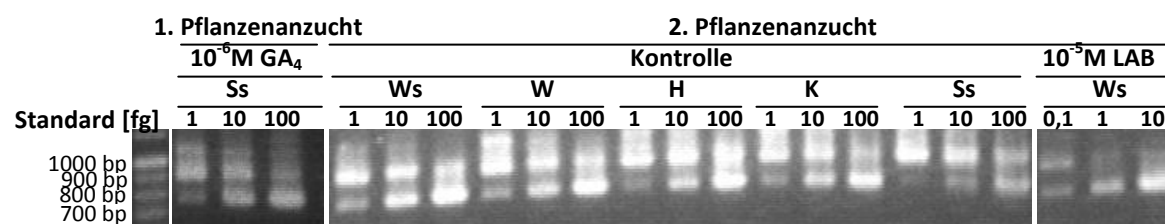
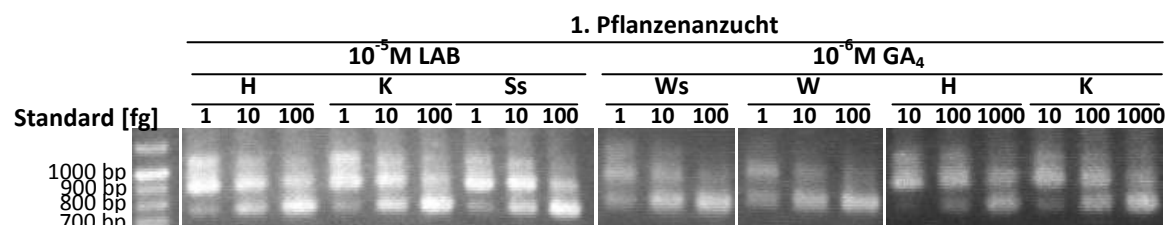
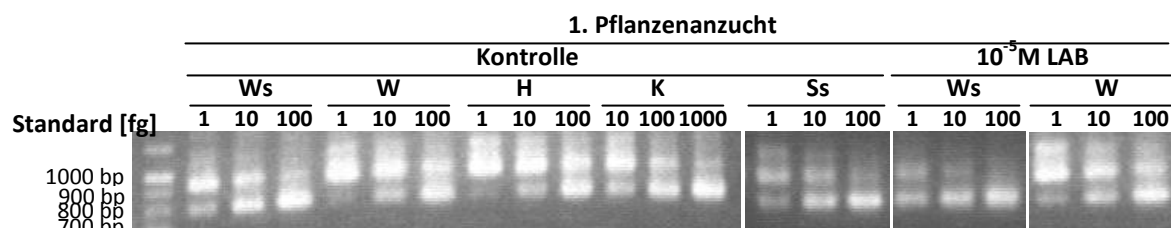


Abb. 6.33: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox3* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 922 bp, Standardbande: 778 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

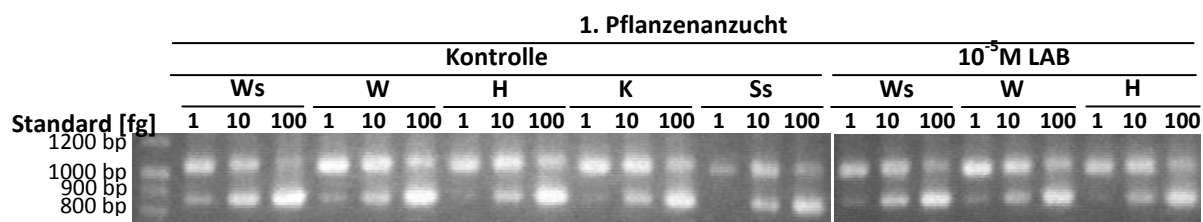


Abb. 6.34a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1a* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 1043 bp, Standardbande: 866 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

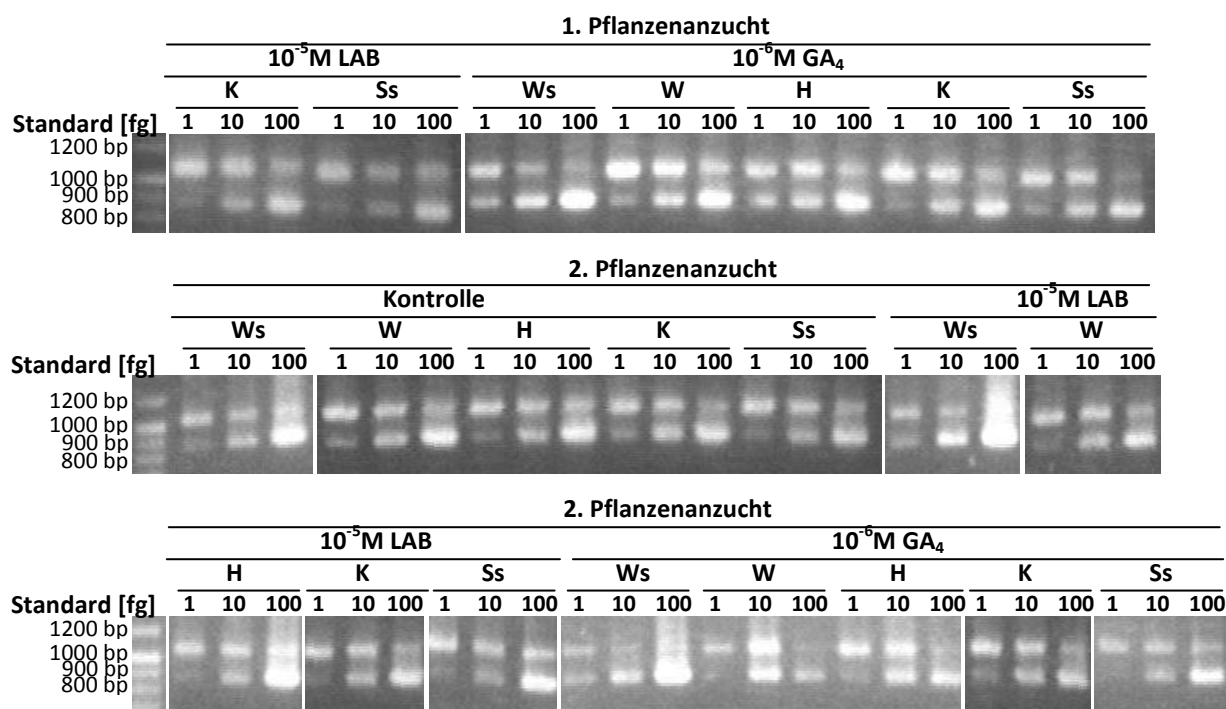


Abb. 6.34b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1a* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 1043 bp, Standardbande: 866 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

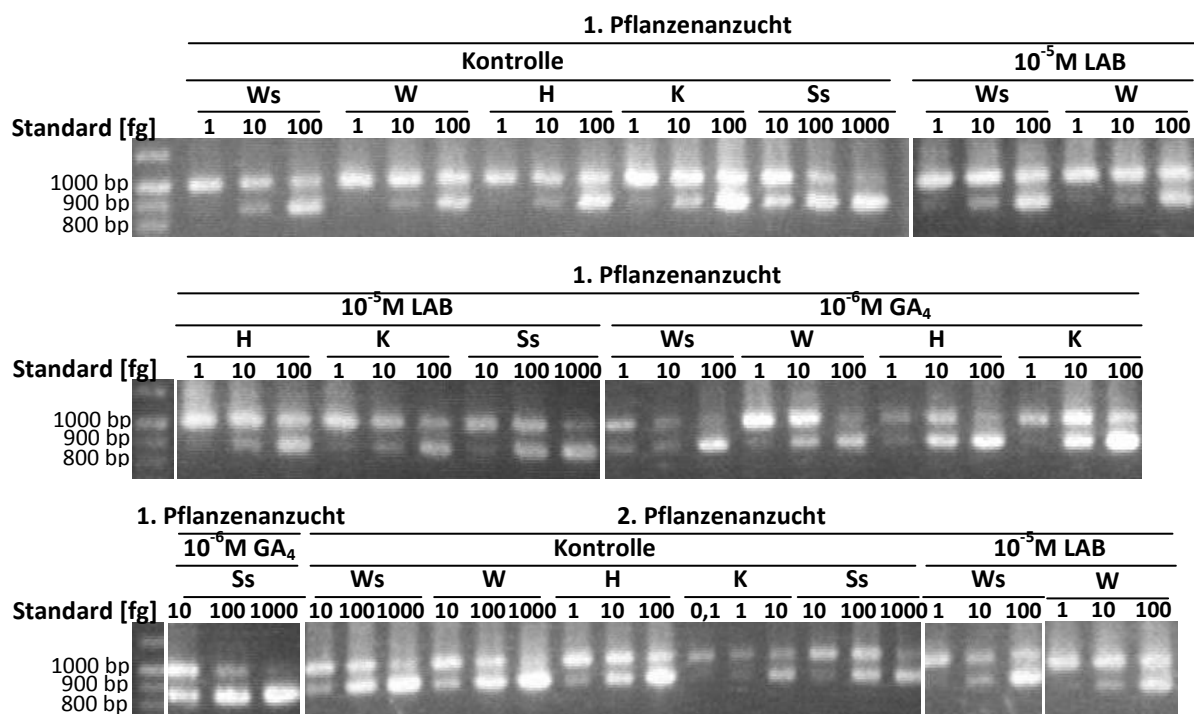


Abb. 6.35a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1b* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 983 bp, Standardbande: 836 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

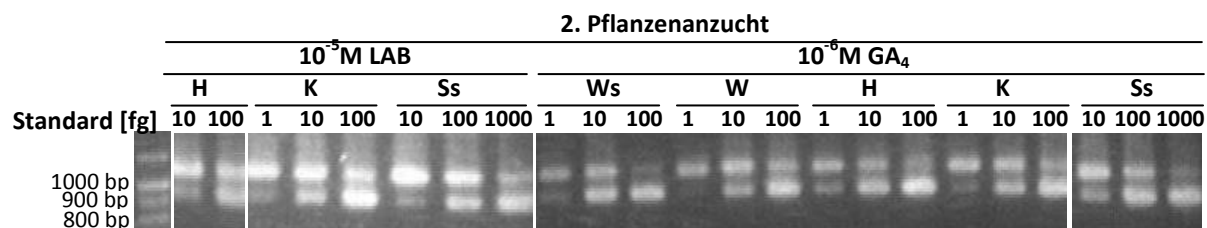


Abb. 6.35b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1b* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 983 bp, Standardbande: 836 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

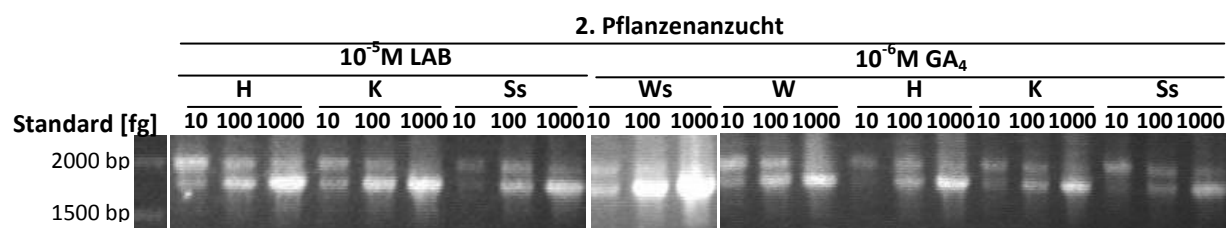
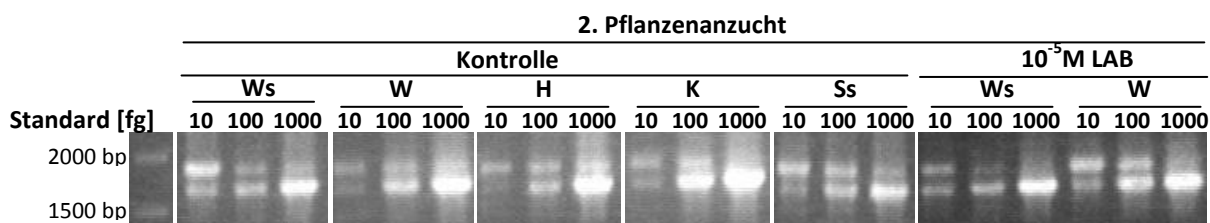
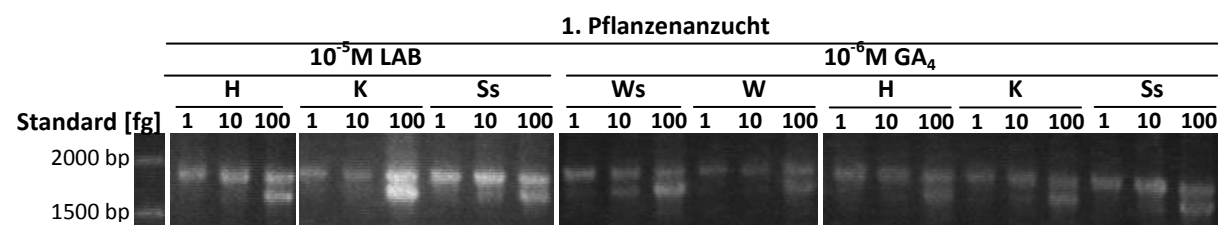
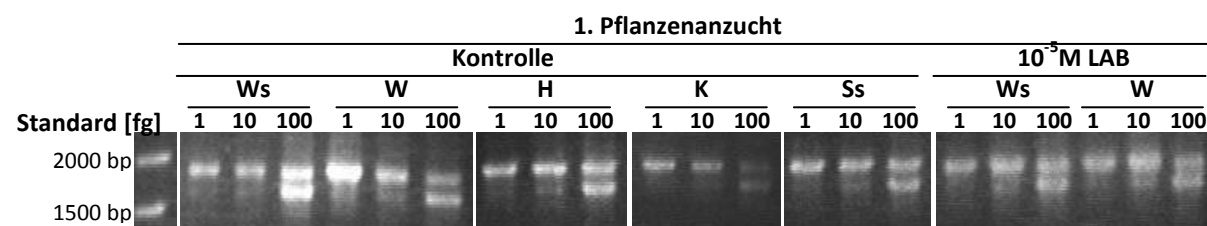


Abb. 6.36: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGAIPa* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 1891 bp, Standardbande: 1681 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

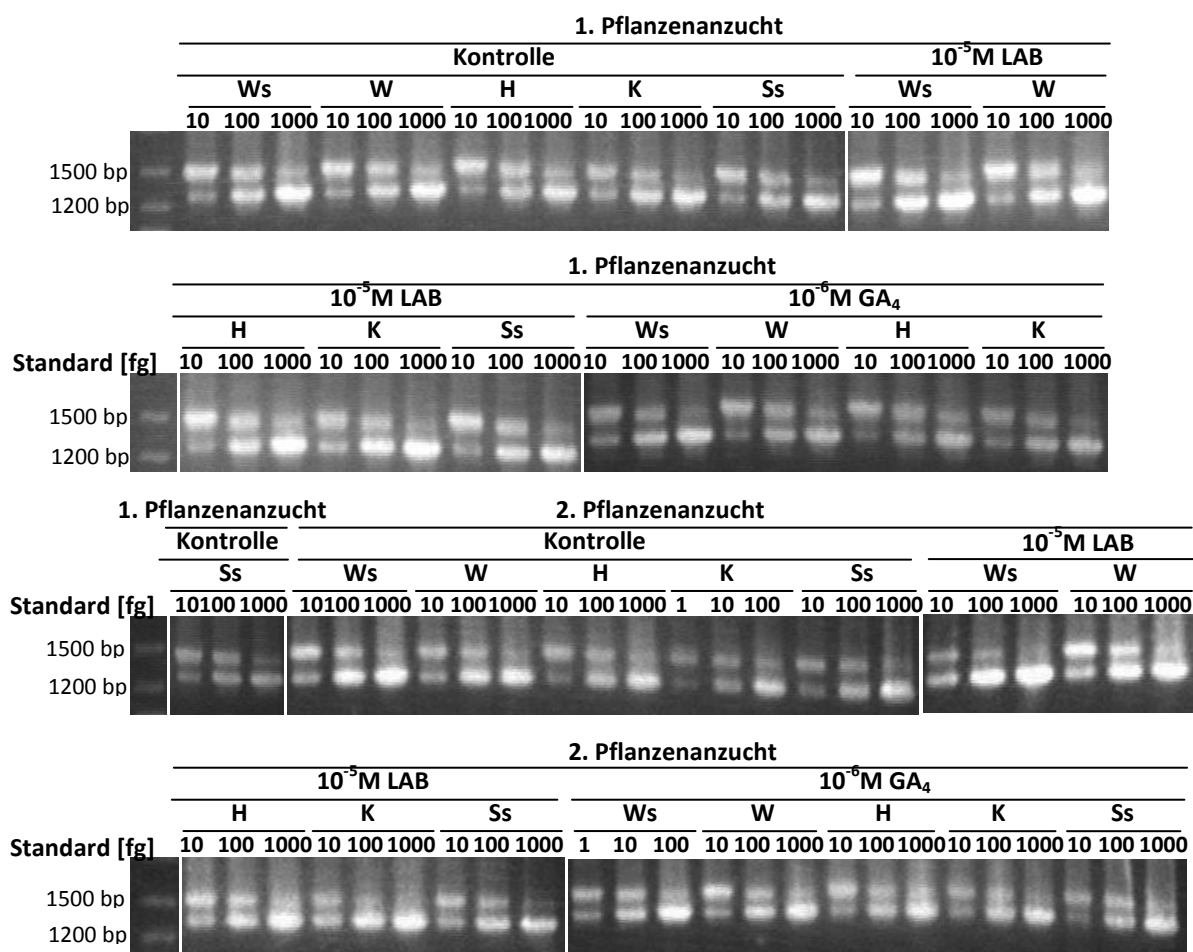


Abb. 6.37: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGAIPb* in den Organen der 7 Tage alten Kürbiskeimlingen bei Behandlung mit Leitungswasser, 10^{-5} M LAB 150 978 bzw. 10^{-6} M GA₄; Transkriptbande: 1484 bp, Standardbande: 1257 bp; Ws: Wurzelspitze, W: Wurzelrest, H: Hypokotyl, K: Kotyledonen, Ss: Sprossspitze

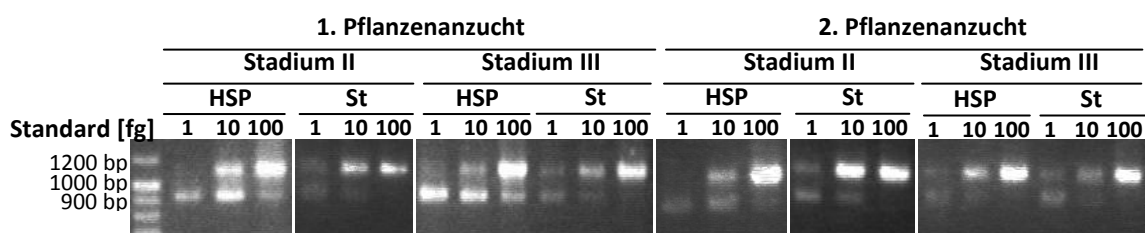


Abb. 6.38: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA7ox* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums II und III; Transkriptbande: 913 bp, Standardbande: 1100 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

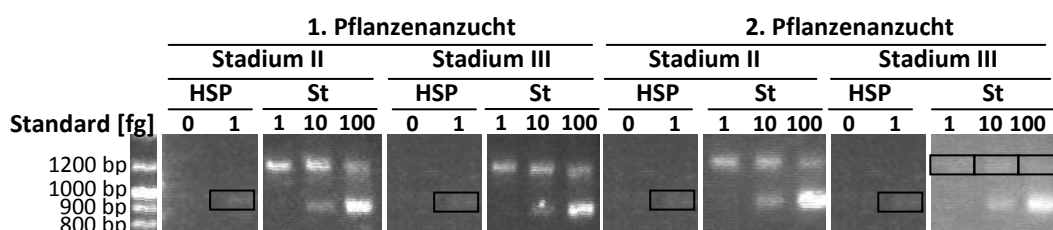


Abb. 6.39: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA20ox3* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums II und III; Transkriptbande: 1170 bp, Standardbande: 872 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

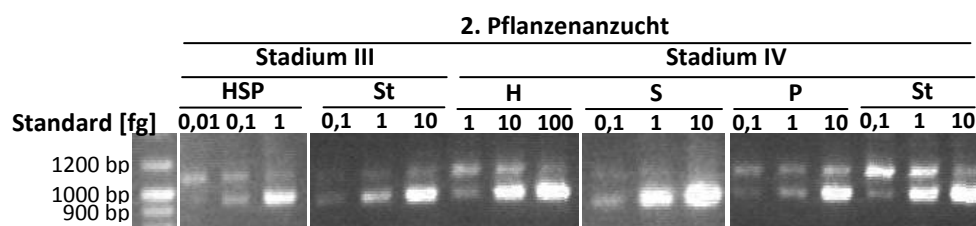
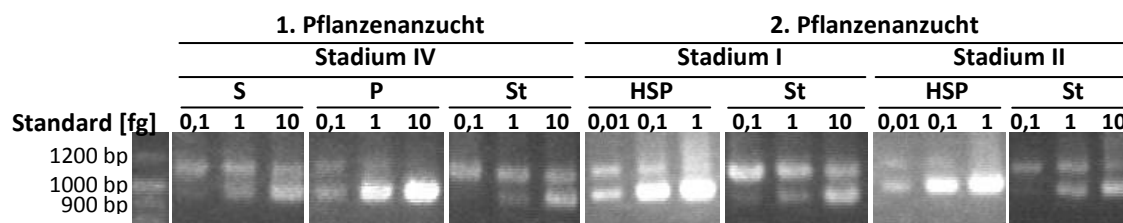
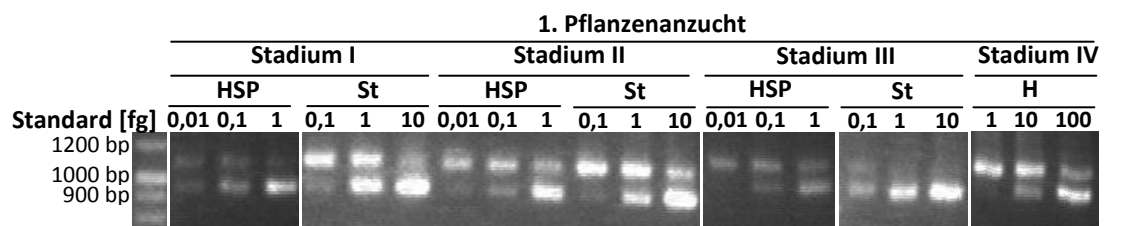


Abb. 6.40: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA20ox4* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 1094 bp, Standardbande: 940 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

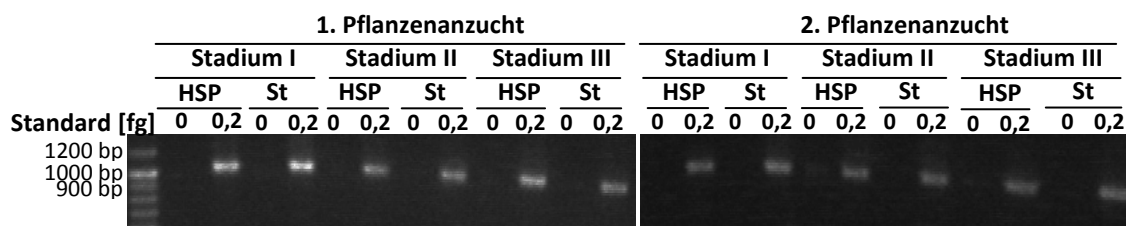


Abb. 6.41: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox1* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums II und III; Transkriptbande: 91 bp, Standardbande: 1050 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

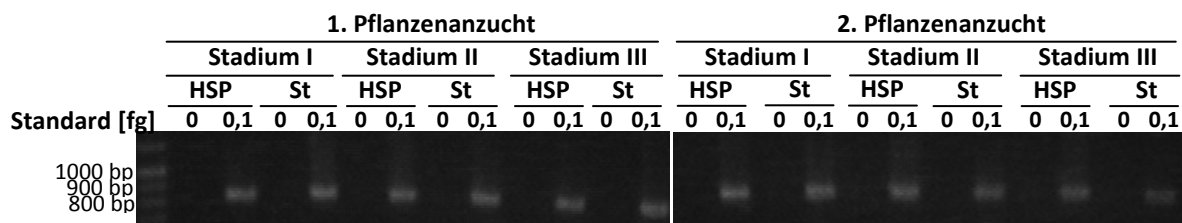


Abb. 6.42: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox2* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums II und III; Transkriptbande: 935 bp, Standardbande: 815 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

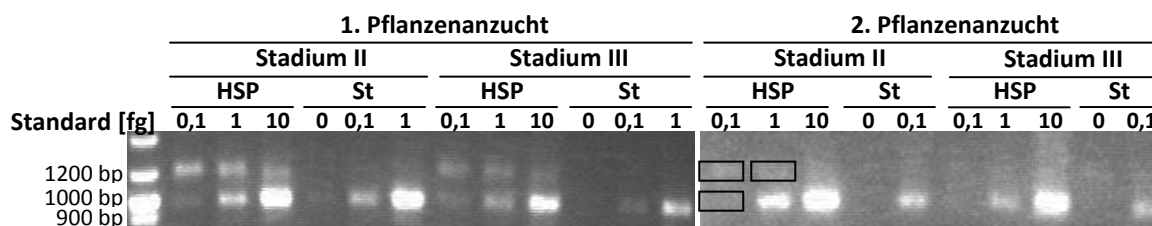


Abb. 6.43: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox3* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums II und III; Transkriptbande: 1193 bp, Standardbande: 963 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

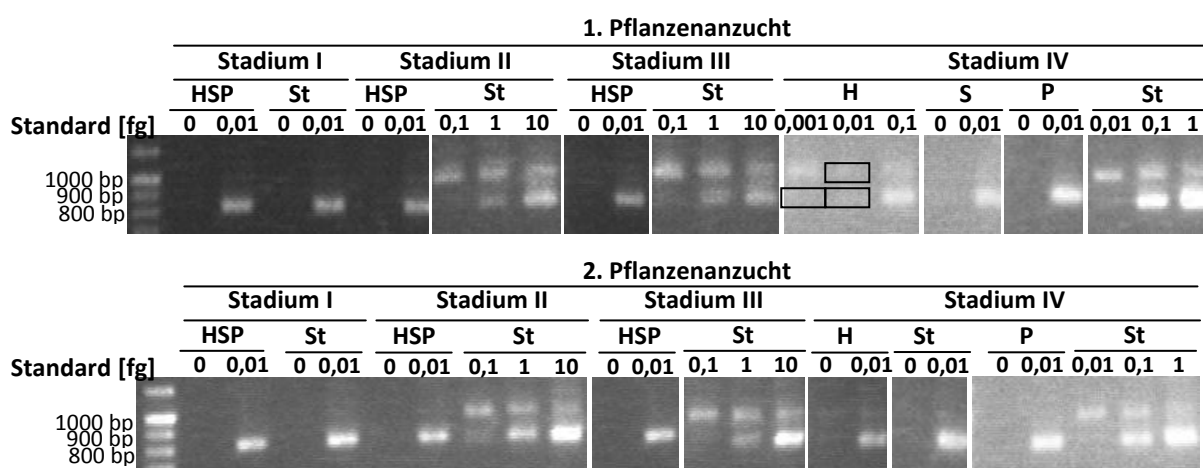


Abb. 6.44: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA3ox4* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 975 bp, Standardbande: 817 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

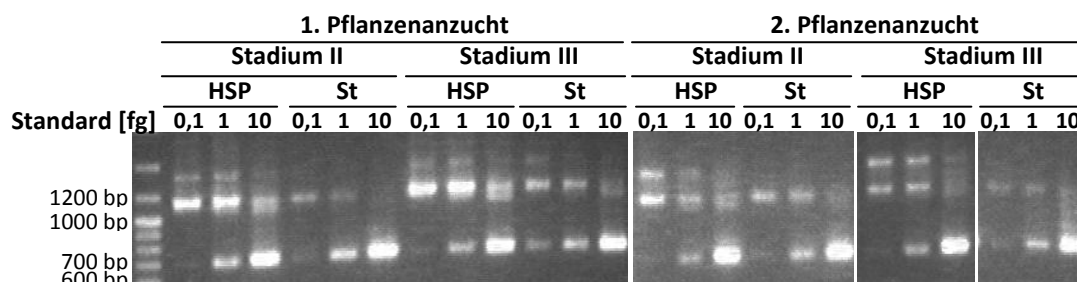


Abb. 6.45: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox1* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums II und III; Transkriptbande: 1132 bp, Standardbande: 684 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

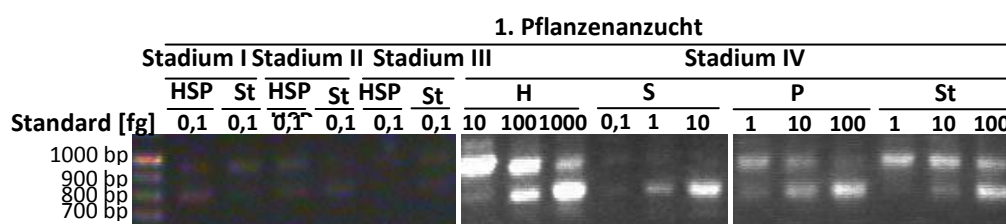


Abb. 6.46a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 943 bp, Standardbande: 786 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

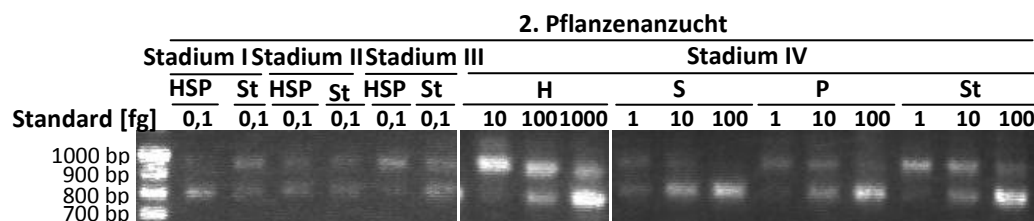


Abb. 6.46b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox2* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 943 bp, Standardbande: 786 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

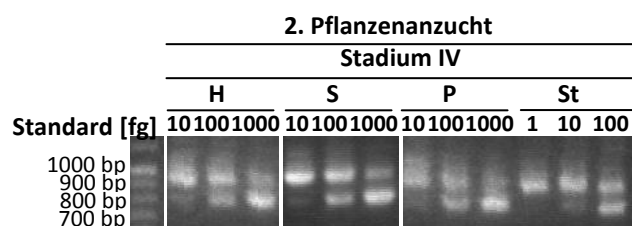
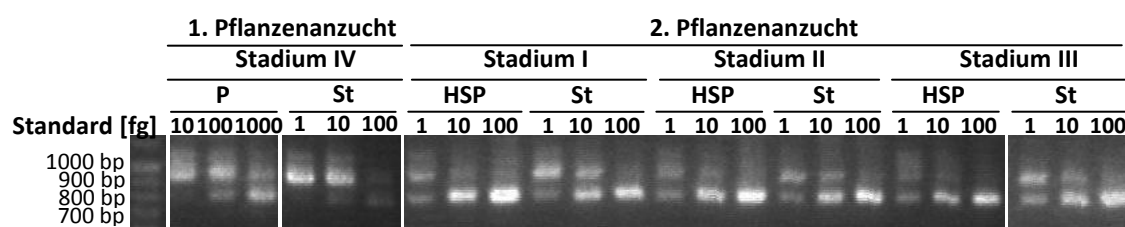
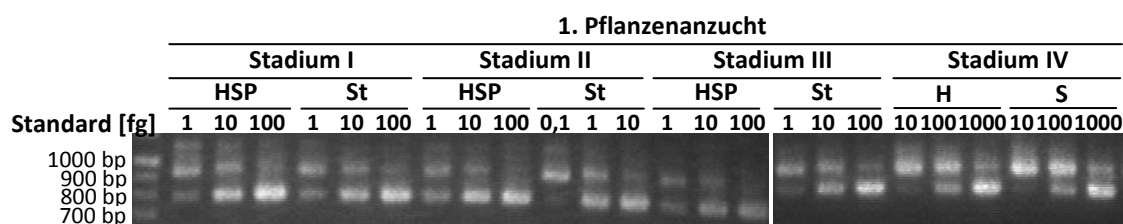


Abb. 6.47: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGA2ox3* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 922 bp, Standardbande: 778 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

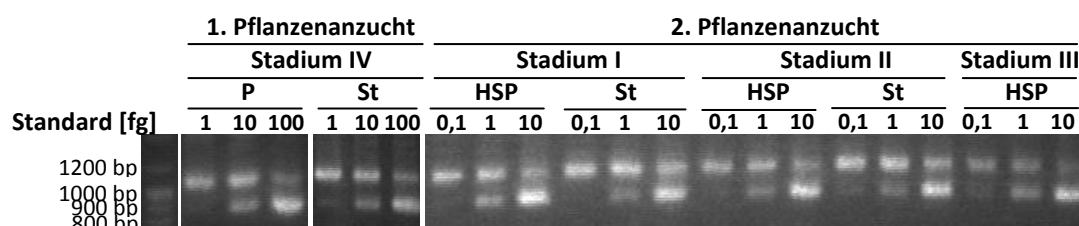
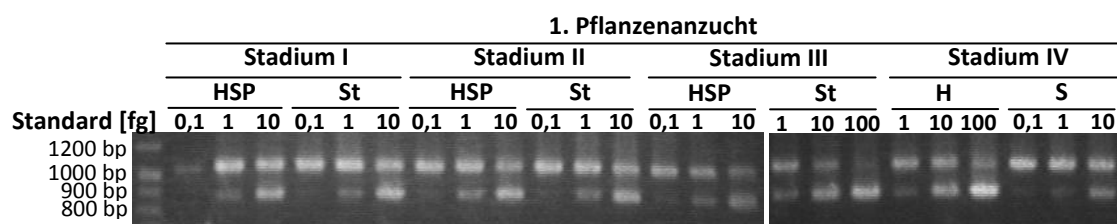


Abb. 6.48a: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1a* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 1043 bp, Standardbande: 866 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

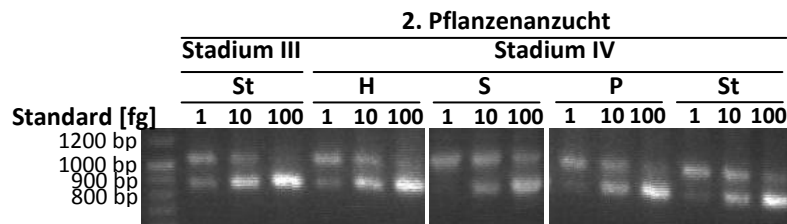


Abb. 6.48b: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1a* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 1043 bp, Standardbande: 866 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

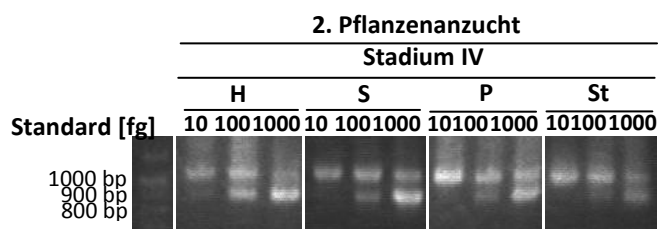
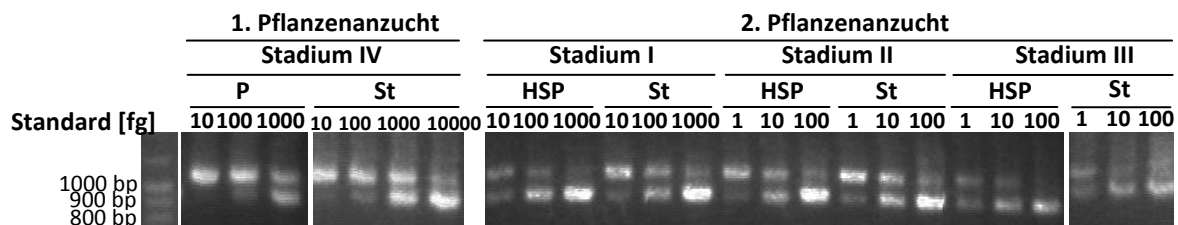
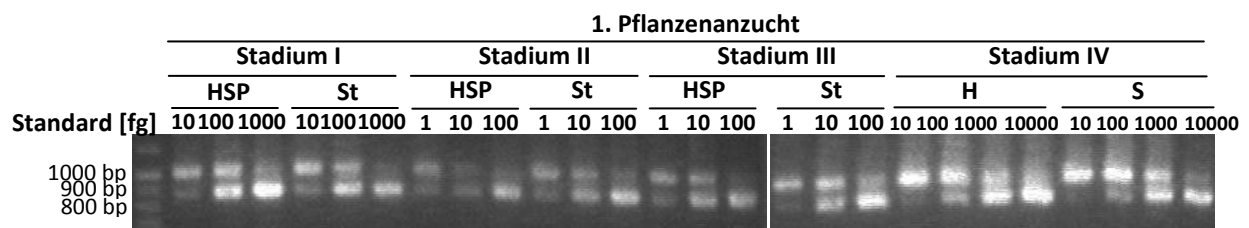


Abb. 6.49: Gelbilder zur Quantifizierung der Transkriptgehalte der *CmGID1b* in den Organen der männlichen Blüten des Stadiums I, II, III und IV; Transkriptbande: 983 bp, Standardbande: 836 bp; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina

6.6 Rohdaten der endogenen Gibberelline

Tab. 6.18: Endogene Gibberellin-Gehalte [ng/g Frischgewicht] in den Organen der männlichen Kürbisblüten des Stadiums I, II, III und IV der ersten Pflanzenanzucht; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * endogener GA-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 ng/g Frischgewicht

	Stadium I		Stadium II		Stadium III		Stadium IV			
	HSP	St	HSP	St	HSP	St	H	S	P	St
GA ₁₂	1,2	1,1	1,1	3,0	1,5	5,8	0,8	/	*	2,1
GA ₁₅	0,5	1,6	0,6	3,3	1,0	2,1	0,3	/	*	1,9
GA ₂₄	0,3	0,3	0,2	1,7	1,5	1,2	0,4	/	0,5	0,3
GA ₉	0,7	3,6	0,9	25,6	0,4	12,2	1,4	/	0,2	3,8
GA ₄	3,4	1,0	6,5	25,6	20,7	56,1	3,5	/	3,8	16,2
GA ₃₄	*	*	*	*	*	0,2	*	/	*	0,2
GA ₅₁	0,5	1,9	*	1,5	0,4	0,3	0,2	/	*	0,2
GA ₂₀	*	*	*	*	*	*	*	/	*	*
GA ₁	*	*	*	*	*	*	*	/	*	*
GA ₈	*	*	*	*	*	*	*	/	*	*

Tab. 6.19: Endogene Gibberellin-Gehalte [ng/g Frischgewicht] in den Organen der männlichen Kürbisblüten des Stadiums I, II, III und IV der zweiten Pflanzenanzucht; H: Hypanthium, P: Petalen, S: Sepalen, St: Stamina; * endogener GA-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 ng/g Frischgewicht

	Stadium I		Stadium II		Stadium III		Stadium IV			
	HSP	St	HSP	St	HSP	St	H	S	P	St
GA ₁₂	1,0	1,9	1,9	4,4	0,5	2,4	/	/	*	0,8
GA ₉	0,2	3,0	0,8	20,3	0,2	12,1	/	/	*	3,1
GA ₄	1,1	0,6	9,6	44,6	14,1	78,1	/	/	9,8	15,3
GA ₃₄	*	*	*	0,2	*	*	/	/	*	0,4

6.7 Messdaten der Kürbispflanzen und Kürbisblüten

Tab. 6.20: Durchschnittliche Internodienlänge und Internodienbreite der 43 Tage alten mit Leitungswasser (n = 4) bzw. mit 10⁻⁴M LAB 150 978 (n = 4) behandelten Kürbispflanzen; die Messung der Internodienlänge erfolgte zwischen den Blattachsen und der Internodienbreite in der Mitte des Internodiums; * signifikanter Unterschied nach Student's t-Test mit einem Signifikanzniveau von 5%; ^a statistische Auswertung auf Grund zu geringer Stichprobenzahl (10⁻⁴M LAB 150 978: n = 2) lediglich bedingt möglich

	Internodienlänge [cm]		Internodienbreite [cm]	
	Kontrolle	10 ⁻⁴ M LAB	Kontrolle	10 ⁻⁴ M LAB
Internodium 1	1,0 ± 0,3	0,3 ± 0,2*	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1*
Internodium 2	1,2 ± 0,6	0,3 ± 0,1*	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2*
Internodium 3	2,9 ± 1,1	0,4 ± 0,1*	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1*
Internodium 4	9,1 ± 3,2	0,4 ± 0,1*	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2*
Internodium 5	13,6 ± 3,3	0,5 ± 0,1*	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1*
Internodium 6	13,8 ± 3,2	0,5 ± 0,2*	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2
Internodium 7	14,5 ± 4,2	0,7 ± 0,1*	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Internodium 8	13,8 ± 3,1	0,9 ± 0,1*	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Internodium 9	10,6 ± 3,8	0,9 ± 0,4*	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Internodium 10 ^a	7,8 ± 2,8	1,1 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Tab. 6.21: Durchschnittliche Blattstiellänge, Blattlänge und Blattbreite der 43 Tage alten mit Leitungswasser (n = 4) bzw. mit 10⁻⁴M LAB 150 978 (n = 4) behandelten Kürbispflanzen; die Messung der Blattlänge erfolgte an Hand der Mittelrippe und der Blattbreite in der Mitte des Blattes; * signifikanter Unterschied nach Student's t-Test mit einem Signifikanzniveau von 5%; ^a statistische Auswertung auf Grund zu geringer Stichprobenzahl (10⁻⁴M LAB 150 978: n = 2) lediglich bedingt möglich; I: Internodium

	Blattstiellänge [cm]		Blattlänge [cm]		Blattbreite [cm]	
	Kontrolle	10 ⁻⁴ M LAB	Kontrolle	10 ⁻⁴ M LAB	Kontrolle	10 ⁻⁴ M LAB
I 5	12,7 ± 1,4	3,4 ± 0,9*	13,0 ± 0,8	6,2 ± 1,2*	18,6 ± 3,4	9,5 ± 2,5*
I 6	11,0 ± 1,5	2,6 ± 0,9*	10,6 ± 1,8	5,3 ± 1,2*	16,2 ± 2,4	8,2 ± 2,8*
I 7	9,8 ± 3,0	3,3 ± 0,3*	10,4 ± 2,7	5,6 ± 0,5*	14,1 ± 3,3	8,3 ± 0,6*
I 8	9,6 ± 1,8	2,3 ± 0,5*	11,6 ± 1,4	4,9 ± 0,6*	14,1 ± 1,9	6,4 ± 1,2*
I 9	8,6 ± 1,7	1,8 ± 0,4*	9,3 ± 1,1	4,0 ± 0,1*	11,9 ± 1,6	5,2 ± 0,6*
I 10 ^a	6,5 ± 1,7	2,3 ± 1,2	7,3 ± 0,5	4,0 ± 0,8	9,1 ± 1,5	4,7 ± 1,4

Tab. 6.22: Vergleich der Anzahl männlicher und weiblicher Blüten der 43 Tage alten Kürbispflanzen der zweiten Pflanzenanzucht bei Behandlung mit Leitungswasser (n = 4) bzw. 10^{-4} M LAB 150 978 (n = 4)

	männliche Blüten					weibliche Blüten
	I	II	III	IV	gesamt	gesamt
Kontrolle	12 ± 5	5 ± 2	3 ± 1	3 ± 2	107 ± 41	6 ± 2
10^{-4} M LAB	8 ± 3	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	145 ± 3	8 ± 3

Tab. 6.23: Durchschnittliche Längen der Organe der männlichen Kürbisblüten (*Cucurbita maxima* L.) der Stadien I – IV (n = 10, n = 5, n = 5 bzw. n = 5) der zweiten Pflanzenanzucht bei Behandlung mit Leitungswasser bzw. mit 10^{-4} M LAB 150 978; bei den Stadien I, II und III wurde lediglich die Länge der außen sichtbaren Petalen vermessen; * signifikanter Unterschied nach Student's t-Test mit einem Signifikanzniveau von 5%

		Länge [cm]				
		Blütenstiel	Hypanthium	Sepalen	Petalen	Stamina
Stadium I	Kontrolle	1,2 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1
	10^{-4} M LAB	0,8 ± 0,2 ^a	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1
Stadium II	Kontrolle	8,3 ± 3,1	0,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,3
	10^{-4} M LAB	2,9 ± 0,5 ^a	0,9 ± 0,04	1,7 ± 0,4	2,4 ± 0,3	1,7 ± 0,1
Stadium III	Kontrolle	11,6 ± 2,7	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,2	4,0 ± 0,6	2,2 ± 0,3
	10^{-4} M LAB	3,8 ± 0,7 ^a	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	3,8 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Stadium IV	Kontrolle	23,2 ± 5,8	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2	6,6 ± 1,3	2,5 ± 0,1
	10^{-4} M LAB	6,6 ± 1,1 ^a	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	5,6 ± 0,2	2,3 ± 0,1

6.6 Gelbilder des Nachweis der viralen RNA und der Transkripte

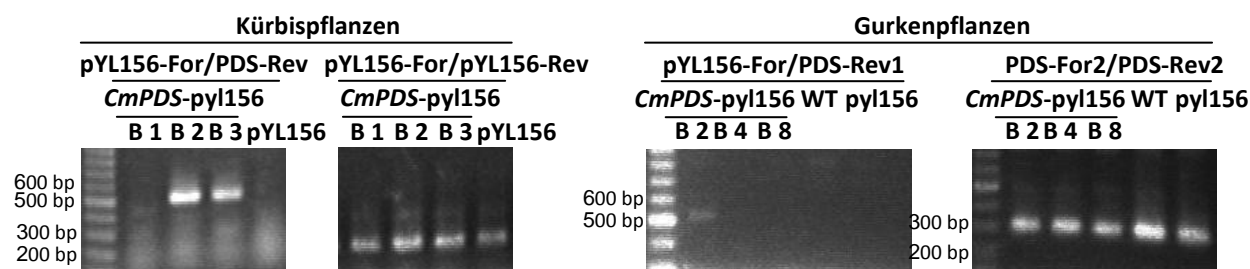


Abb. 6.50: Nachweis der viralen RNA in den Blättern des Wildtyps, der mit pYL156 bzw. der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Kürbis- und Gurkenpflanzen sowie semiquantitative RT-PCR zur Ermittlung der relativen Transkriptgehalte an *CsPDS* in den Blättern des Wildtyps, der mit pYL156 bzw. der mit *CmPDS*-pYL156 infizierten Pflanzen

Die in dieser Arbeit zitierten Sequenzen bekannter Gibberellin-Dioxygenasen bzw. bekannter Phytoene-Desaturasen sind unter der jeweiligen Acession Nr. in der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) oder unter der angegebenen Gene ID (jeweils beginnend mit Csa) in der Cucumber Genome Database (<http://cucumber.genomics.org.cn/>) erhältlich.

Literaturverzeichnis

- Aach, H., Bode, H., Robinson, D.G., Graebe, J.E. (1997). *ent*-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. *Planta* 202: 211-219
- Aach, H., Böse, G., Graebe, J.E. (1995). *ent*-Kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings and the localisation of *ent*-kaurene synthetase in plastids of three species. *Planta* 197: 333-342
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current Biology* 19: 1188-1193
- Benedito, V.A., Visser, P.B., Angenent, G.C., Krens, F.A. (2004). The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes *Genetics and Molecular Research* 3(3): 323-341
- Benková, E., Hejátko, J. (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol Biol* 69: 383-396
- Brian, P.W., Hemming, H.G. (1955). The effect of gibberellic acid on shoot-growth of pea seedlings. *Physiologia Plantarum* 8: 669-681
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A. M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D. C., Baker, B., Jones, J.D.G. (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 39: 264-272
- Budzikiewicz, H. (1980). Massenspektrometrie. Verlag Chemie, Weinheim
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal* 39: 734-746
- Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S.P. (2006). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 21-27
- Carrera, E., Jackson, S.D., Prat, S. (1999). Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiology* 119: 765-773
- Carzoli, F.G., Michelotti, V., Fambrini, M., Salvini, M., Pugliesi, C. (2009). Molecular cloning and organ-specific expression of two gibberellin 20-Oxidase genes of *Helianthus annuus*. *Plant Mol Biol Rep* 27:144-152
- Chen, J.-C., Jiang, C.-Z., Gookin, T.E., Hunter, D.A., Clark, D.G., Reid, M.S. (2004). Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Mol. Biol.* 55: 521-530

- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., Peng, J. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131(5):1055-64
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y.-C., Chung, E.J., Oh, S.-K., Lee, S., Park, J.M., Joung, Y.H., Choi, D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol. Cells* 17(2): 377-380
- Collett, C.E., Harberd, N.P., Leyser, O. (2000). Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Plant Physiology* 124: 553-561
- Cosgrove, D.J., Sovonick-Dunford, S.A. (1989). Mechanism of gibberellin-dependent stem elongation in peas. *Plant Physiol.* 89: 184-191
- Cowling, R.J., Harberd, N.P. (1999). Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *Journal of Experimental Botany* 50(337): 1351-1357
- De Boer, T.J., Backer, H.J. (1954). A new method for the preparation of diazomethane. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 73: 229-234
- De Carolis, E., De Luca, V. (1994). 2-oxoglutarate-dependent Dioxxygenase and related enzymes: biochemical characterization. *Phytochemistry* 36(5):1093-107
- Derbyshire, P., McCann, M.C., Roberts, K. (2007). Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol.* 17;7:31.
- Dill, A., Sun, T.-P. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 777-785
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., Sun, T.-P. (2004). The *Arabidopsis* F-Box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *The Plant Cell* 16: 1392-1405
- Dogbo, O., Camara, B. (1987). Purification of isopentyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 920, 140-148
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I., Llave, C. (2008). Structural and genetic requirements for the biogenesis of *Tobacco Rattle Virus*-derived small interfering RNAs. *Journal of Virology* 82(11): 5167–5177
- Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O. (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* 37: 1356 - 1360
- Fischer, A. (2004). Expressionsprofile ausgewählter Gibberellin-Oxidase-Gene während wichtiger Entwicklungsstadien von *Cucurbita maxima* L. Diplomarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- Fleet, C., Sun, T.-P. (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 77-85
- Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques* 26: 112-125
- Frenzel, E. (2009). Expressionsstudien von Gibberellin-Signaltransduktionsgenen während der Blütenentwicklung beim Kürbis. Bachelorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- Frisse, A. (1999). Untersuchungen zur Expression von Gibberellin-Dioxygenase Genen in Kürbiskeimlingen. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen
- Frisse, A., Pimenta, M.J., Lange, T. (2003). Expression studies of gibberellin oxidases in developing pumpkin seeds. *Plant Physiology* 131: 1220-1227

- Fu, X., Harberd, N.P. (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421(6924): 740-743
- Fu, D.-Q., Zhu, B.-Z., Zhu, H.-L., Zhang, H.-X., Xie, Y.-H., Jiang, W.-B., Zhao, X.-D., Luo, Y.-B. (2006). Enhancement of Virus-induced Gene Silencing in Tomato by Low Temperature and Low Humidity. *Mol. Cells* 21(1): 153-160
- Fuchs, E., Atsmon, D., Halevy, A.H. (1977). Adventitious staminate flower formation in gibberellin treated gynoeceious cucumber plants. *Plant Sf CeUPhrsid.* 18: 1193-1201
- Fukazawa, J., Nakata, M., Ito, T., Yamaguchi, S., Takahashi, Y. (2010). The transcription factor RSG regulates negative feedback of NtGA20ox1 encoding GA 20-oxidase. *The Plant Journal* 62: 1035-1045
- Galinha, C., Bilsborough, G., Tsiantis, M. (2009). Hormonal input in plant meristems: A balancing act. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 1149-1156
- Gallego-Giraldo, L., Ubeda-Tomás, S., Gisbert, C., García-Martínez, J.L., Moritz, T., López-Díaz (2008). Gibberellin homeostasis in tobacco is regulated by gibberellin metabolism genes with different gibberellin sensitivity. *Plant Cell Physiol.* 49(5): 679-690
- García-Martínez, J.L., Gil, J. (2002). Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *Journal of Plant Growth and Regulation* 20: 354-368
- Ghosh, S., Basu, P.S. (1982). Effect of some growth regulators on sex expression of *Momordica charantia* L. *Scientia Horticulturae* 17: 107-112
- Gould, B., Kramer, E. M. (2007). Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *The Plant Methods* 3(1): 1-12
- Graebbe, J.E. (1982). Gibberellin biosynthesis in cell-free systems from higher plants. In PF Wareing, ed, *Plant Growth Substances 1982*. Academic Press, London, pp 71-80
- Graebbe, J.E. (1985). Gibberellin biosynthesis from gibberellin A12-aldehyde. In M Bopp, ed, *Plant Growth Substances 1985*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 74-82
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden. P., Sun, T.-P., Thomas, S.G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18: 3399-3414
- Hammond, S.M. (2005). Dicing and slicing The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters* 579: 5822-5829
- Hartweck, L.M. (2008). Gibberellin signaling. *Planta* 229(1):1-13
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S., Tsiantis, M. (2002). The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology* 12: 1557-1565
- Haywood, V., Yu, T.-S., Hunag, N.-C., Lucas, W.J. (2005). Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *The Plant Journal* 42: 49-68
- Hedden, P., Phillips, A. (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5(12): 523-30
- Hedden, P., Thomas, S. (2006). *Plant Hormone Signaling*, Annual Plant Reviews, Volume 24. Publisher: Wiley Blackwell
- Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5(10): 446-451

- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (2001a). The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *PNAS* 98(4): 2065–2070
- Helliwell, C.A., Poole, A., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1999). Arabidopsis *ent*-Kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* 119: 507–510
- Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (2001b). A plastid envelope location of Arabidopsis *ent*-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *The Plant Journal* 28(2): 201-208
- Hileman, L. C., Drea, S., de Martino, G., Litt, A., Irish, V. F. (2005). “Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant Journal* 44(2): 334-341
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *The EMBO Journal* 22(17): 4523-4533
- Hu, J., Mitchum, M.G., Barnaby, N., Ayele, B.T., Ogawa, M., Nam, E., Lai, W.-C., Hanada, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Swain, S.M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Sun, T.-P. (2008). Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 20(2): 320-336
- Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W.J., Wang, X., Xie, B., Ni, P. et al. (2009). The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics* 41: 1275-1281
- Igarashi, D., Ishida, S., Fukazawa, J., Takahashi, Y. (2001). 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *Plant Cell* 13: 2483-2497
- Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, M., Takahashi, H., Yoshikawa, N. (2009). Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, Arabidopsis thaliana, cucurbits, and legumes. *Virology* 386: 407–416
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., Yamaguchi, J. (2001). *Slender* rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *The Plant Cell* 13: 999-1010
- Ishida, S., Fukazawa, J., Yuasa, T., Takahashi, Y. (2004). Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. *The Plant Cell* 16: 2641-2651
- Ishida, S., Yuasa, T., Nakata, M., Takahashi, Y. (2008). A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins. *The Plant Cell* 20: 3273-3288
- Itoh, H., Tanaka-Ueguchi, M., Kawaide, H., Chen, X., Kamiya, Y., Matsuoka, M. (1999). The gene encoding tobacco gibberellin 3 β -hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development. *The Plant Journal* 20(1): 15-24
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *The Plant Cell* 14: 57-70

- Iuchi, S., Suzuki, H., Kim, Y.-C., Iuchi, A., Kuromori, T., Ueguchi-Tanaka, M., Asami, T., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Kobayashi, M., Nakajima, M. (2007). Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *The Plant Journal* 50: 958-966
- Izhaki, A., Borochoy, A., Zamski, E., Weiss, D. (2002). Gibberellin regulates postmicrosporogenesis processes in petunia anthers. *Physiologia Plantarum* 115: 442-447
- Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E. (1991). Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the gib-1 mutant of tomato. *Plant Physiol.* 97: 409-414
- Jung, J., Rentzea, C., Rademacher, W. (1986). Plant growth regulation with triazoles of the dioxanyl type. *J Plant Growth Regul* 4:181-188
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T., Helm, J.M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell* 100: 13-26
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. (2002). Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in *Arabidops*. *The Journal of Biological Chemistry* 277(47): 45188–45194
- King, K.E., Moritz, T., Harberd, N.P. (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159: 767-776
- Knop, N. (2007). Regulation des Gibberellin-Haushaltes während der Blütenentwicklung in *Cucurbita maxima* L. Diplomarbeit, Technische Universität Carolo- Wilhelmina zu Braunschweig
- Koorneef, M., van der Veen, J.H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. genet.* 58: 257-263
- Kufka, J. (2007). Klonierung und Expression von Gibberellin-Rezeptoren aus *Cucurbita maxima* L. Diplomarbeit, Technische Universität Carolo- Wilhelmina zu Braunschweig
- Kumagai, M. H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., Grill, L.K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1679-1683
- Lange, T. (1994). Purification and partial amino-acid sequence of gibberellin 20-oxidase from *Cucurbita maxima* endosperm. *Planta* 195: 108 – 115
- Lange, T. (1997a). Cloning gibberellin dioxygenase genes from pumpkin endosperm by heterologous expression of enzyme activities in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6553-6558
- Lange, T. (1998). Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta* 204: 409-419
- Lange, T., Graebe, J.E. (1993). Enzymes of gibberellin synthesis. In PJ Lea, ed, *Methods in Plant Biochemistry* pp 403-430
- Lange, T., Hedden, P., Graebe, J.E. (1994a). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8552-8556
- Lange, T., Kappler, J., Fischer, A., Frisse, A., Padeffke, T., Schmidtke, S., Pimenta Lange, M.J. (2005). Gibberellin biosynthesis in developing pumpkin seedlings. *Plant Physiology* 139: 213-223
- Lange, T., Robatzek, S., Frisse, A. (1997b). Cloning and expression of a gibberellin 2 β ,3 β -hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm. *The Plant Cell* 9: 1459-1467

- Lange, T., Schweimer, A., Ward, D.A., Hedden, P., Graebe, J.E. (1994b). Separation and characterisation of three 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases from *Cucurbita maxima* L. endosperm involved in gibberellin biosynthesis. *Planta* 195: 98-107
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibitions. *Genes & Development* 16: 646-658
- Lee, L.-Y., Gelvin, S.B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology* 146: 325-332
- Liu, E., Page, J.E. (2008). Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods* 4:5
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P. (2002a). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 30(4): 415-429
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P. (2002b). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* 31(6): 777-786
- Lu, R.; Martin-Hernandez, A.M.; Peart, J.R.; Malcuit, I.; Baulcombe, D.C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30(4): 296-303
- MacFarlane, S.A. (1999). Molecular biology of the tobnaviruses. *Journal of General Virology* 80: 2799-2807
- MacFarlane, S.A. (2010). Tobnaviruses-plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol Plant Pathol* 11(4): 577-583
- MacMillan, J., Suter, P.J. (1958). The occurrence of gibberellin A1 in higher plants: Isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*). *Naturwissenschaften* 45: 46-53
- MacMillan, J., Takahashi, N. (1968). Proposed procedure for the allocation of trivial names to the gibberellins. *Nature* 217: 170-171
- Matsushita, A., Furumoto, T., Ishida, S., Takahashi, Y. (2007). AGF1, an AT-Hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase. *Plant Physiology* 143: 1152-1162
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.-P., Steber, C.M. (2003). The *Arabidopsis* *SLEEPY1* gene encodes a putative F-Box subunit of an SCF 3 ubiquitin ligase. *The Plant Cell* 15: 1120-1130
- Mishra, R.S., Pradhan, B. (1967). The effect of (2-chloroethyl) trimethyl ammonium chloride on sex expression in cucumber. *Journal of Horticultural Science* 45: 29-31
- Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., Sun, T.-P. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *The Plant Journal* 45: 804-818
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.-P., Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456(7221): 459-63
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.-C., Park, S.-H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., Yamaguchi, I. (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *The Plant Journal* 46: 880-889
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W., Choi, G. (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 47: 124-139

- Olimpieri, O., Caccia, R., Picarella, M.E., Pucci, A., Santangelo, E., Soressi, G.P., Mazzucato, A. (2011). Constitutive co-suppression of the GA 20-oxidase1 gene in tomato leads to severe defects in vegetative and reproductive development. *Plant Science* 180: 496-503
- Olszewski, N., Sun, T.-P., Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14 Suppl: S61-80
- Orashakova, S., Lange, M., Lange, S., Wege, S., Becker, A. (2009). The CRABS CLAW ortholog from California poppy, (*Eschscholzia californica*, Papaveraceae), EcCRC, is involved in floral meristem termination, gynoecium differentiation, and ovule initiation. *Plant J.* 58: 682-693
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H., Granell, A. (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology* 140: 3-11
- Penfield, S., Josse, E.M., Kannangara, R., Gilday, A.D., Halliday, K.J., Graham, I.A. (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr. Biol.* 15: 1998-2006
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., Harberd, N.P. (1997). The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* 11: 3194-3205
- Perl-Treves, R., Kahana, A., Roseman, N., Xiang, Y., Silberstein, L. (1998). Expression of multiple *AGAMOUS-like* genes in male and female flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Physiol.* 39(7): 701-710
- Peterson, C. E., Anghder, L. D. (1960). Induction of staminate flowers on gynoecious cucumbers with gibberellin A₃. *Science* 131: 1673-1674
- Phillips, A., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E.J., Lange, T., Huttly, A.K., Caskin, P., Graebe, J.E., Hedden, P. (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-Oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108: 1049-1057
- Pimenta Lange, M.J., Lange, T. (2006). Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biol.* 8: 281-290
- Purkayastha, A., Dasgupta, I. (2009). Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 967-976
- Radley, M. (1956). Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature* 178: 1070-1071
- Ratcliff, F., Martín-Hernández, A. M., Baulcombe, D. C. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25(2): 237-245
- Rebers, M., Kaneta, T., Kawaide, H., Yamaguchi, S., Yang, Y.-Y., Imai, R., Sekimoto, H., Kamiya, Y. (1999). Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *The Plant Journal* 17(3): 241-250
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G., Phillips, A.L., Hedden, P. (2008a). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *The Plant Journal* 53: 488-504
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., Phillips, A.L. (2008b). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 2420-2436

- Robertson, D. (2004). VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 495–519
- Ryu, C.-M., Anand, A., Kang, L., Mysore, K.S. (2004). Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. *The Plant Journal* 40: 322-331
- Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S., Matsuoka, M. (2001). KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes & Development* 15:581-590
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.-H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299(5614):1896-8
- Shao, Y., Zhu, H. L., Tian, H. Q., Wang, X. G., Lin, X. J., Zhu, B. Z., Xie, Y. H., Luo, Y. B (2008). Virus-induced gene silencing in plant species. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(2): 168-174
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456(7221): 520-3
- Silverstone, A., Ciampaglio, C.N., Sun, T.-P. (1998). The Arabidopsis *RGA* Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway. *The Plant Cell* 10: 155-169
- Smith, M.W., Ymaguchi, S., Ait-Ali, T., Kamiya, Y. (1998). The first step of gibberellin biosynthesis in pumpkin is catalyzed by at least two copalyl diphosphate synthases encoded by differentially regulated genes. *Plant Physiol.* 118: 1411–1419
- Sun, T.-P., Gubler, F. (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 197-223
- Sun, T.-P., Kamiya, Y. (1997). Regulation and cellular localization of *ent*-kaurene synthesis. *Physiologia Plantarum* 101(4): 701-708
- Takahashi, N., Kitamura, H., Kawarada, A., Seta, Y., Takai, M., Tamura, S., Sumiki, Y. (1955). Biochemical studies on 'bakanae' fungus. Part XXXIV. Isolation of gibberellins and their properties. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 19: 267-277
- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., Maule, A.J. (2001). Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant Journal* 25(4): 417-425
- Thomas, S.G., Phillips, A.L., Hedden, P. (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4698-4703
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Sun, T.-P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiology* 135: 1008-1019
- Tzfira, T., Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 147-154
- Ubeda-Tomás, S., Bennett, M.J. (2010). Plant Development: Size Matters, and It's All Down to Hormones. *Current Biology* 20(12): R511-R513
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., Bennett, M.J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Current Biology* 19. 1194-1199

- Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swaruo, K., Laplaze, L., Beemster, G.T.S., Hedden, P., Bhalerao, R., Bennett, M.J. (2008). Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol.* 10(5): 625-628
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.-Y., Hsing, Y.-I., Kitano, H., Yamaguchi, I., Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437(7059): 693-8
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., Matsuoka, M. (2007). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:183-98
- Unver, T., Budak, H. (2009). Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *Int J Plant Genomics.* 2009: 198680
- van den Heuvel, K.J.P.T., Barendse, G.W.M., Wullems, G.J. (2001). Effect of gibberellic acid on cell division and cell elongation in anthers of the gibberellin deficient gib-1 mutant of tomato. *Plant Biol.* 3: 124-131
- Wang, Y., Li, J. (2008). Molecular basis of plant architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 253-79
- Ward, D.A., MacMillan, J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P. (2010). Gibberellin 3-oxidases in developing embryos of the southern wild cucumber, *Marah macrocarpus*. *Phytochemistry* 71: 2010-2018
- Wen, C.K., Chang, C. (2002). *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14: 87–100
- Weston, D.E., Elliott, R.C., Lester, D.R., Rameau, C., Reid, J.B., Murfet, I.C., Ross, J.J. (2008). The pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiology* 147: 199-205
- Willige, B., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M.N., Maier, A., Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19(4):1209-20
- Yabuta, T. (1935). Biochemistry of the 'bakanae' fungus of rice. *Agriculture and Horticulture* 10: 17-22
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:225–51
- Yamaguchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. (2004). Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 16: 367-78
- Yaxley, J.R., Ross, J.J., Sherriff, L.J., Reid, J.B. (2001). Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiology* 125: 627-633
- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., Meyerowitz, E.M. (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(20): 7827-7832
- Zhao, X., Yu, X., Foo, E., Symons, G.M., Lopez, J., Bendehakkalu, K.T., Xiang, J., Weller, J.L., Liu, X., Reid, J.B., Lin, C. (2007). A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiology* 145: 106-118

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Theo Lange für die Bereitstellung dieses Themas bedanken. Seine stete Diskussionsbereitschaft, Geduld und die vielen Anregungen zu diesem interessanten Thema waren motivierend und hilfreich zugleich.

Bei Frau Dr. Maria J. Pimenta Lange möchte ich mich für die Einweisung in die molekularbiologischen Arbeiten und für die stets unverzügliche Hilfe bei Fragen und Problemen bedanken.

Anja Liebrandt möchte ich für die Hilfe bei der Charakterisierung der rekombinanten Gibberellin-Dioxygenasen sowie der Quantifizierung der endogenen Gibberelline danken. Auch werde ich ihre Unterstützung und Aufheiterungsversuche nie vergessen, die mir immer wieder die langen Labortage verkürzt haben.

Zum Schluss möchte ich meiner Mutter und meiner Familie danken ohne deren Unterstützung, Hilfe und Geduld ich nie dahin gekommen wäre, wo ich jetzt bin.